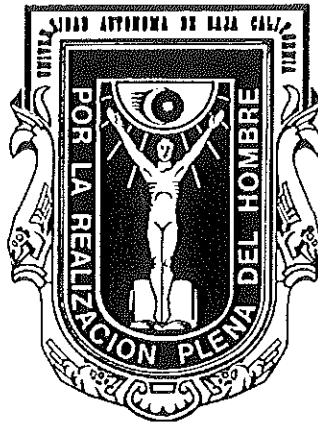


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA



**Caracterización Genética de Poblaciones de
Acartia californiensis (Copepoda: Calanoida) en la Costa
Nororiental del Pacífico**

Tesis

que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera

Presenta

M. en C. Antonio Trujillo Ortiz



Ensenada, Baja California, 30 de agosto del 2002.

HYATT
NEWPORTER

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

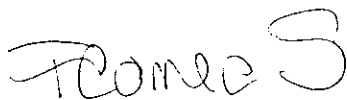
**Caracterización Genética de Poblaciones de
Acartia californiensis (Copepoda: Calanoida) en la Costa
Nororiental del Pacífico**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

Presenta

M. en C. Antonio Trujillo Ortiz

Aprobada por:



Dr. Francisco Correa Sandoval
Director de Tesis



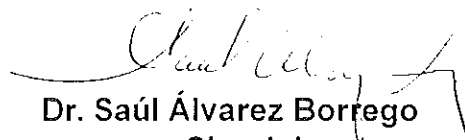
Dr. Ronald Scott Burton
Sinodal



Dr. Jorge de la Rosa Vélez
Sinodal



Dr. Roberto Millán Núñez
Sinodal



Dr. Saúl Álvarez Borrego
Sinodal

DEDICATORIA

"Con todo mi amor a mi esposa Sara por su incondicional compañía y a mis hijos Rodolfo Antonio por su comprensión y paciencia, Fernando Alberto por su auxilio con los GATTACA's y Elizabeth Michelle por su ayuda con los datos de alozimas...Por todo el hermoso tiempo que me han regalado en la vida"

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a la memoria del Dr. Abraham Fleminger por introducirme al fascinante estudio de los copépodos y que estoy seguro que en el cielo también los estudia.

A los miembros de mi comité de tesis Drs. Francisco Correa Sandoval por su paciencia, amistad, apoyo incondicional y aceptar ser mi director de tesis; Ronald S. Burton de Scripps Institution of Oceanography de la Universidad de California en San Diego, por heredarme y compartir sus conocimientos en el campo de la genética molecular, y por abrirme las puertas de su laboratorio en donde realicé mis primeros "pininos" y, finalmente, la totalidad de los análisis de las muestras para esta tesis; mostrando en todo momento interés y preocupación cuando las cosas no salían bien, Eugenio Carpizo me dió el "tip" del trabajo de genética de Ron con el también copépodo *Tigriopus californicus*, vaya a él todo mi aprecio; Jorge de la Rosa Vélez por sus excelentes clases de serendipia genética. Roberto Millán Núñez por todo su apoyo e interés, y Saúl Álvarez Borrego por ser verdadera inspiración en el quehacer científico de todos sus "hijos" y "entenados" en oceanografía.

Especial agradecimiento a Tamy Ballard por su fundamental ayuda en el análisis de las muestras y a toda la "familia" del laboratorio de Ron.

A la Dra. Carol E. Lee de la Universidad de Washington por su amistad y tenacidad durante su estancia posdoctoral en Scripps.

Al Dr. Jorge Olmos Soto del CICESE por introducirme en mis primeros coqueteos con el ADN y el *Genes IV* de Lewin.

Muchas, muchas personas apoyaron de una manera u otra y creyeron en esta propuesta de investigación como el Dr. Charles Miller de la Univesidad Estatal de Oregon en Corvallis, Dr. William T. Peterson del Hatfield Marine Science Center en Oregon, Dr. William Hamner de la Universidad de California en Los Angeles, y Drs. Steven Bollens y Sean Avent del Romberg Tiburon Center en San Francisco. Otras pocas no creyeron ni apoyaron, pero eso me hizo proseguir con más ahínco.

A los Drs. Meredith Gould Chambers y José Luis Stephano Hornedo de la Facultad de Ciencias por sus acertados consejos.

Al corporativo del Hotel Hyatt Newporter de Newport California por su patrocinio a este proyecto de investigación al facilitarnos todas sus instalaciones para todo lo necesario; en especial a Scott Allen.

Al CONACyT, PROMEP, Fundación TELMEX y PEPA-UABC por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma de Baja California, nuestra *Alma mater*, por todo el apoyo que me brindó, es especial a mi amigo Victor E. Beltrán Corona actual Rector.

Al Dr. Mark E. Huntley de la Universidad de Hawaii por ser mi maestro y enseñarme la ecología del zooplancton y la producción secundaria.

A John O'Sullivan y personal del Acuario de Monterey en California por su amistad y facilidades brindadas para hacer visitas guiadas de nuestros estudiantes a sus instalaciones.

A mi colega y amigo Dr. Santos Silva Cota, primer rector de nuestra universidad.

A mis siempre amigos Enrique y Socorro Carrillo y familia por su siempre decidido apoyo.

A Ernesto Hernández y Karina Barba por su colaboración en apoyo técnico.

A Marthita, Rosario, Lorena, Nelly, Mary y Angélica por su siempre reconfortante sonrisa y amabilidad.

A Doña Tere por ser una segunda madre para mí y por sus acertados consejos y ayudas.

A Roberto Calderón, Rodrigo de la Peña, Francisco Becerril y Gerardo Díaz por su apoyo en el trabajo de campo en el "tour" científico que realizamos en nuestras bien improvisadas instalaciones rodantes (casa-laboratorio) por todos los estados y costas de Oregon, California, Baja California y Baja California Sur: por los 12,000 km recorridos...por los buenos y no tan buenos momentos.

A todos mis alumnos y ahijados de siempre que me inspiran a seguir superándome: a ellos me debo.

A todos mis compañeros de trabajo en la Universidad Autónoma de Baja California, en especial los de nuestra Facultad de Ciencias Marinas; compañeros socios de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés, A. C. (AIMAC), en especial a Cruz del Carmen Juárez Olvera, compañeros miembros de la SIGMA XI, The Scientific Research Society, en especial a George T. Hemingway, y a la Asociación de Oceanólogos de México, A. C., en especial a mi 'compadre' Francisco Aranda Manteca y familia.

A mis pastores Donaciano y Elsa Pérez y todos mis hermanos en Cristo por su amor y amistad.

Va todo mi cariño a mis padres Fernando y Ma. de la Luz, y a mis hermanos Leonor, Cristina, Eduardo, Fernando (*QEPD*), Verónica y Salvador.

A mi Eterno Dios y Salvador por darme la vida y la oportunidad de ser hecho su hijo y permitirme seguir estudiando la ciencia. Amén.

TODO A PULMÓN

Qué difícil se me hace mantenerme en este viaje sin saber a dónde voy en realidad, si es de ida o de vuelta, si el furgón es la primera, si volver es una forma de llegar.

Qué difícil se me hace cargar todo este equipaje, se hace dura la subida, el caminar, esta realidad tirana que se ríe a carcajadas porque espera que me canse de buscar.

Cada nota, cada idea, cada paso en mi carrera y la estrofa de mi última canción, sí, cada fecha postergada, la salida y la llegada y el oxígeno de mi respiración, y todo a pulmón, y todo a pulmón...

Qué difícil se me hace mantenerme con coraje, lejos de la transa y la prostitución, defender mi ideología, buena o mala pero mía, tan humana como la contradicción.

Qué difícil se me hace seguir pagando el peaje de esta ruta de locura y ambición, un amigo en la carrera, una luz y una escalera, y la fuerza de hacer todo a pulmón...

Alejandro Lerner
(Argentino, 1983)

"Una lección bien aprendida, siempre será una lección bien enseñada"

RESUMEN

El copépodo calanoide marino *Acartia californiensis* es un zooplanctonte endémico, dominante y restringido a estuarios y lagunas costeras de la costa nororiental del Pacífico. No existen reportes de adultos en mar abierto. En este trabajo de tesis se presentan los resultados de la estructura genética determinada por la técnica de variantes alélicas de enzimas y el análisis molecular por secuenciación del ADN mitocondrial de poblaciones localizadas en costas de Oregon y California, EUA, y Baja California y Baja California Sur, México.

Para el análisis alozimático por microelectroforesis vertical en gel de poliacrilamida se realizaron dos experimentos. Uno preliminar entre dos poblaciones cercanas: Mission Bay y Estero Punta Banda. El otro se hizo extensivo a otras poblaciones registradas de la especie: Yaquina Bay, San Francisco Bay, Marina del Rey, San Pedro Bay, Sunset Beach Marina, Newport Bay, San Quintín, Laguna Ojo de Liebre, Laguna de Guerrero Negro y Bahía de La Paz, incluyendo las del primer experimento. De doce sistemas enzimáticos ensayados, las poblaciones de *A. californiensis* revelaron patrones de bandeo confiables para cuatro sistemas con cuatro loci (APK, EST, G6PDH y PGI), de los cuales sólo PGI-1 fue polimórfico para las doce poblaciones. El dendrograma (UPGMA) generado con la distancia modificada de Rogers presentó una correlación cofenética de 0.91, pudiendo identificar cinco grupos [1(Yaquina Bay, Laguna Ojo de Liebre, La Paz), 2(Marina del Rey, San Pedro Bay, Newport Bay, Mission Bay, Estero Punta Banda), 3(Sunset Beach Marina, Bahía de San Quintín), 4(San Francisco Bay) y 5(Laguna de Guerrero Negro)]. La prueba de Mantel no mostró ser significativa en la correlación de la distancia genética y geográfica. El análisis de correlación canónica resultó significativo sólo entre las frecuencias alélicas y la salinidad *in situ*.

En el análisis molecular se usaron los iniciadores universales LCO1490: 5'-ggtaacaaatcataaagatattgg-3' y HCO2198: 5'-taaacttcagggtgacaaataatca-3' para amplificar por reacción en cadena de la polimerasa un fragmento de 710 bp del gene ADN mitocondrial citocromo-oxidasa c subunidad I (COI). Los datos de la secuenciación del ADNmt (660 bp) fueron obtenidos de 2-5 individuos adultos por población usando un autosecuenciador ABI 373 y siguiendo los protocolos estándar para los reactivos Big-dye. Con los datos se construyeron árboles genéticos de máxima parsimonia. El análisis reveló cuatro clados bien diferenciados con bajos niveles de divergencia intraclados. Las muestras de Yaquina Bay (Oregon) y San Francisco Bay (norte de California) comprendieron los dos clados más divergentes (promediando 23% de pares de diferencias no corregidas); las muestras del sur de California a la parte central de Baja California (Marina del Rey, Sunset Beach Marina, Mission Bay, Estero Punta Banda y Laguna de Guerrero Negro) y las de La Paz, Baja California Sur, formaron dos clados adicionales menos divergentes (aproximadamente 7% de divergencia).

Por medio de un experimento de hibridación se obtuvo éxito reproductivo entre las poblaciones de Mission Bay y Estero Punta Banda, hasta la segunda generación filial.

Las técnicas genéticas utilizadas muestran resultados contrastantes. Por un lado, el análisis alozimático empleado mostró polimorfismo para PGI que probablemente refleja una selección como respuesta fisiológica y bioquímica al medio ambiente, agrupando poblaciones que tienden a responder de la misma manera, más que elucidar una diferenciación genética poblacional. Es necesario hacer estudios intensivos a diferentes niveles para investigar cual es el proceso de selección asociado que permita correlacionarlos con el polimorfismo encontrado, probar más sistemas amortiguadores o hacer ensayos con la técnica de acetato de celulosa.

Por otro, en base al tamaño de muestra chico, el análisis molecular da resultados más concluyentes y reveladores. Las secuencias sugieren una estructura geográfica de cuatro grupos bien delimitados por las provincias biogeográficas cálido-templadas del Pacífico nororiental. La marcada diferenciación genética por esta técnica sugiere la existencia de un flujo génico altamente restringido entre muchos de los estuarios muestreados. Al parecer, los procesos oceanográficos físicos son los responsables del aislamiento a gran escala entre las poblaciones de *A. californiensis* estudiadas.

ÍNDICE

CAPÍTULO I

BIOLOGÍA DEL COPÉPODO CALANOIDE MARINO

<i>Acartia californiensis</i> TRINAST	1
I.1. Generalidades y Antecedentes	1
I.2. Propósito	8
I.3. Objetivos y Metas	9
I.3.1. Objetivos	9
I.3.2. Metas	9
I.4. Hipótesis	9
I.5. Área de Estudio	10
I.6. Referencias	12
I.7. Figuras y Tablas	18

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN DE *Acartia californiensis* POR ANÁLISIS ALOZIMÁTICO

II.1. Introducción	26
II.2. Materiales y Métodos	28
II.2.1. Origen de las poblaciones	28
II.2.2. Colecta	28
II.2.3. Preservación de los organismos	30
II.2.4. Homogenización de los organismos	31
II.2.5. Elaboración del gel de poliacrilamida	31
II.2.6. Montaje en placas de gel de poliacrilamida	32
II.2.7. Sistemas enzimáticos	32
II.2.8. Sistema amortiguador	35
II.2.9. Electroforesis	35
II.2.10. Análisis y procesamiento de los datos	35
II.3. Resultados	37
II.3.1. Análisis preliminar entre dos poblaciones cercanas	37
II.3.2. Variabilidad aloenzimática extensivo a más poblaciones	39
II.4. Discusión	42
II.5. Referencias	46
II.6. Figuras y Tablas	50

CAPÍTULO III

ANÁLISIS MOLECULAR DE *Acartia californiensis* POR ADN MITOCONDRIAL

III.1. Introducción	68
III.2. Materiales y Métodos	77
III.2.1. Preservación	77
III.2.2. Extracción del ADN genómico total	77
III.2.3. Amplificación del ADN por PCR	78
III.2.4. Limpieza del producto de PCR	80
III.2.5. Purificación del producto a secuenciar	80
III.2.6. Secuenciación del ADN en un sentido (HCO:3'-5')	81
III.2.7. Análisis de datos	81
III.3. Resultados	83
III.4. Discusión	87
III.5. Referencias	91
III.6. Figuras y Tablas	100

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DE INTER E INTRACRUZAMIENTO ENTRE DOS

POBLACIONES DE <i>Acartia californiensis</i>	127
IV.1. Introducción	127
IV.2. Materiales y Métodos	128
IV.3. Resultados	131
IV.4. Discusión	131
IV.5. Referencias	133

IV.6. Figuras y Tablas.....	135
CAPÍTULO V	
DISCUSIONES Y CONCLUSIONES GENERALES	137
V.1. Discusiones.....	137
V.2. Conclusiones.....	153
V.3. Recomendaciones	154
V.4. Referencias	155
V.5. Figuras y Tablas.....	162
APÉNDICE	166

CAPÍTULO I

BIOLOGÍA DEL COPÉPODO CALANOIDE MARINO *Acartia californiensis* TRINAST

I.1. Generalidades y Antecedentes

Los copépodos son el grupo de crustáceos más grande y diversificado que existe (Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Crustacea; Maxillopoda; Copepoda). En la actualidad incluye a más de 11,500 especies, 1,633 géneros y 198 familias (Humes, 1994), que son, seguramente, un número subestimado; el número de especies descritas en los últimos 30 años es de cerca de dos tercios del total en los cien años previos. Habitan aguas marinas y continentales, hábitats semiterrestres ó viven en relaciones simbióticas con otros organismos. Se considera que son el grupo multicelular más numeroso sobre la tierra, sobrepasando aún a los insectos, que incluyen un mayor número de especies, pero con pocos individuos (Raymont. 1983).

En la última década la sistemática de los copépodos ha sido sujeta a muchas revisiones. De acuerdo a Huys y Boxshall (1991), se reconocen diez órdenes (**Figura 1.1**), la mitad de los cuales (Misophrioida,

Monstrilloida, Mormonilloida, Siphonostomatoida y Poecilostomatoida) en su mayoría contiene especies exclusivamente parásitas ó simbióticas, y los otros (Platycopioida, Gelyelloida, Calanoida, Harpacticoida y Cyclopoida), incluyen a las formas de vida libre.

Los copépodos de vida libre frecuentemente componen más del 70% de la fauna planctónica (Raymont, 1983) y son la principal fuente de alimento para otros zooplanctontes, incluyendo larvas de peces; en este sentido, constituyen así los productores secundarios del medio ambiente marino y el paso fundamental en la trofodinámica del océano.

Acartia es el único género en la familia Acartiidae. Hasta el año 2000 se habrían descrito 96 especies (**Tabla 1.1**) pertenecientes a los ocho subgéneros propuestos por Steuer (1923) y no se duda que aún se puedan describir nuevas especies. Este género está ampliamente distribuido y registrado en todos los océanos (Subbaraju, 1967). Los copépodos calanoides pertenecientes a este género a menudo están presentes en abundancia en aguas costero-estuarinas (Uye y Fleminger, 1976; Uye, 1982, Castel y Courties, 1982; Miller, 1983, Paffenhöfer y Sterns, 1988); existen algunas especies representativas del mar abierto como *A. danae* y *A. negligens* (Bowman, 1971). De acuerdo a Paffenhöfer y Sterns (1988) este importante grupo de copépodos, fundamentalmente está adaptado a las altas concentraciones de alimento que se encuentran en estuarios y aguas de surgencias.

Acartia californiensis (Subgénero Acanthacartia: grupo Rostrata de Steuer, 1923) fue descrita por Trinast (1976). Es una especie endémica

del Pacífico Nororiental y aparentemente restringida a las partes más internas de cuerpos de agua costeros como esteros y lagunas (Trujillo-Ortiz, 1986).

Zimmerman (1972), Frolander *et al.* (1973), Johnson (1974), Johnson y Miller (1974) y Miller *et al.* (1977) ya habían trabajado con *Acartia californiensis*, pero debido a su gran parecido a *A. tonsa*, y dado que aún no había sido descrita como una nueva especie, la confundieron con ella. La consideraron una variante ecofenotípica pequeña de *A. tonsa* que es oceánica, más grande y está presente en la Corriente de Davidson durante el invierno. En otros estudios Trinast (1975) la llamó *Acartia* n. sp., y Uye y Fleminger (1976) *Acartia* sp.1.

Debido a la similitud de *Acartia californiensis* con *A. tonsa*, Dawson (1980) realizó una investigación con base a caracteres como la razón longitud-ancho del segmento genital de las hembras y la razón longitud-ancho del segundo segmento del urosoma en los machos; lo anterior fue con el propósito de obtener una forma más fácil y confiable de diferenciarlas.

Es probable que la especie denominada *Acartia bacorehuisensis* encontrada en aguas de la laguna costera de Agiabampo, Sonora, México (26°15' N y 109°15' O), descrita por Zamora-Sánchez y Gómez-Aguirre (1985), pudiera ser, de acuerdo a la comparación de los caracteres morfoanatómicos presentados por Trinast (1974) y Trujillo-Ortiz (1986), una sinonimia de *A. californiensis*. En estudios recientes, *A. bacorehuisensis* ha resultado ser una importante especie de copépodo

presente en cultivos de camarón en pozas en Mazatlán, Sinaloa (Gómez-Pasten, com. per.). Brinton *et al.* (1986), mencionan (p. 243) que en la boca de la Laguna de Yavaros (laguna costera en Sonora, México, 26°40' N y 109°30' O), predominaba la especie tropical *A. lilljeborgi*, seguida por la especie *Acartia* sp. (posiblemente *A. tonsa* ó una especie parecida a *A. californiensis*). Esto pudiera indicar que la distribución zoogeográfica de *A. californiensis* probablemente se extienda a regiones costeras del sur del Golfo de California.

De acuerdo a Johnson (1981), *Acartia californiensis* tiene su máxima distribución al norte en la Yaquina Bay en Oregon. En las costas de California se le ha registrado en San Francisco Bay (Johnson, 1981; Ambler *et al.*, 1985), Eklhorn Slough, en Monterey Bay (Pace, 1978), Newport Bay, en Los Angeles (Trinast, 1976), Laguna Peñasquitos y Mission Bay, en San Diego (Uye y Fleminger, 1976). En México, ésta especie ha sido observada en las lagunas de Guerrero Negro, Baja California, y Ojo de Liebre, Baja California Sur (Trujillo-Ortiz, 1990). También ha sido recolectada en San Pedro Bay (Dawson y Knatz, 1980; Soule y Oguri, 1980a) y Marina del Rey (Soule y Oguri, 1980b), en las costas de California.

En Baja California, México, principalmente en el Estero Punta Banda, en la Bahía de Todos Santos, se ha reportado una gran abundancia de *Acartia californiensis*, siendo la especie dominante en más del 95% del ensamblaje zooplanctónico (Méndez-Lanz, 1988; Trujillo-Ortiz, 1986, 1990; Jiménez-Pérez y Lara-Lara, 1990). Es probable que la

distribución de esta especie se extienda hasta el Bajo Golfo de California, en las lagunas de Agiabampo y Yavaros, Sonora (Trujillo-Ortiz, 1990).

Existen muy pocos estudios relacionados con la biología de *Acartia californiensis*. Uno de los primeros trabajos es el de Pace (1978) quien estudió su distribución, abundancia, crecimiento y fecundidad en Elkhorn Slough, en Monterey Bay, California; en su estudio encuentra que el factor más importante en su ocurrencia era la temperatura.

Otro importante trabajo es el de Johnson (1981) quien estudió la dinámica poblacional y la persistencia de cohortes de *Acartia californiensis* en Yaquina Bay, Oregon, y registró ciclos estacionales similares en la distribución y abundancia que se caracterizan por la presencia de seis cohortes persistentes bien definidas al año. También evaluó el efecto de la variación de la temperatura y la salinidad en la producción y viabilidad de los huevos. Un año antes, Johnson (1980) encontró que la terminación del estado latente de los huevos diapáusicos de reposo dependía principalmente de la temperatura, y que la tasa y el éxito de la eclosión eran controlados por la salinidad.

Trujillo-Ortiz (1986) describió por primera vez su ciclo de vida completo [huevo, estadios naupliares (NI a NVI), estadios de copepodito (CI a CV) y adultos (CVI: ♀ y ♂)] bajo condiciones de laboratorio a partir de especímenes procedentes del Estero Punta Banda, Baja California, México. Por otro lado, Trujillo-Ortiz (1990) determinó que el porcentaje de eclosión de los huevos es alto para esta especie (96%), donde reporta que

la producción de huevos varió de 24.75 a 27.35 huevos·hembras⁻¹·día⁻¹ y el tiempo de desarrollo fue de 17.75 días desde huevo hasta la etapa de adulto (CVI), a una temperatura de 17°C±1°C.

Trujillo-Ortiz y Arroyo-Ortega (1991) realizaron el análisis de mortalidad y de esperanza de vida para este organismo. Los resultados mostraron que la mayor incidencia de muertes se presenta durante los primeros estadios, factor que puede estar ligado a la terminación del saco vitelino, disponibilidad del alimento en el medio y a los cambios fisiológicos durante su crecimiento. Encontraron que las mayores probabilidades de vida fueron para los estadios adultos (CVI). Morales-Zamorano *et al.* (1991) han descrito a *Acartia californiensis* como la especie más importante de la cadena trófica en el Estero Punta Banda, B. C.

Trujillo-Ortiz *et al.* [1995 (**Capítulo II**) y presente trabajo] estudiaron la variación genética de dos poblaciones de *Acartia californiensis* procedentes del Estero Punda Banda, B.C., México y Mission Bay, California, EE.UU. Los autores registran que la distancia genética de Nei entre las poblaciones es de 0.006 y señalan una falta de diferenciación entre ambas poblaciones. Estos autores proponen la existencia de un flujo genético entre las dos poblaciones, probablemente debido a través de la dispersión pasiva de los huevos diapáusicos de reposo que produce esta especie; estos huevos son llevados fuera ó dentro por el flujo y reflujo mareal y transportados hacia el sur por la Corriente de California y hacia el norte por la Contracorriente costera de Davidson.

Badillo-Padilla (1996) y Trujillo-Ortiz *et al.* (1996) realizaron estudios para determinar la tasa específica de pastoreo y de filtración para *Acartia californiensis* en el Estero Punta Banda, B. C. Los resultados mostraron que se presenta una tasa de alimentación bien definida y que las variaciones día a día son el resultado de la interacción con los factores del medio ambiente. La tasa de filtración durante la variación diurna *in situ* fue más intensa durante la noche que en el día, y que las hembras presentaban una mayor tasa de pastoreo y filtración. Determinaron también que del total de carbono producido por el fitoplancton del estero, sólo un 24.39% fue consumido por *A. californiensis*, quedando el resto disponible para ser utilizado por otros niveles tróficos ó ser exportado al exterior del estero por las corrientes de marea.

Otro estudio importante sobre la biología reproductiva es el de Trujillo-Ortiz *et al.* [1999 y presente trabajo (**Capítulo IV**)] quienes realizaron estudios de intercrusa entre las poblaciones de *Acartia californiensis* del Estero Punta Banda, Baja California, México y Mission Bay, California, EE.UU., encontrando resultados de éxito reproductivo hasta la segunda generación filial (F_2); los autores corroboran, desde el punto de vista reproductivo, los resultados genéticos por alozimas de un experimento previo [Trujillo-Ortiz *et al.* ,1995 y presente trabajo (**Capítulo II**)].

1.2. Propósito

Después de presentar los antecedentes sobre diferentes aspectos de la biología y ecología del copépodo calanoide marino *Acartia californiensis*, en los cuales se destacan su amplia distribución a lo largo de la costa nororiental del Pacífico y su confinamiento exclusivo al interior de los cuerpos de agua costeros como estuarios y lagunas. De acuerdo a Trujillo-Ortiz *et al.* (1995), se propone realizar un estudio genético interpoblacional geográficamente amplio para esta especie, utilizando la técnica de microelectroforesis en gel de poliacrilamida. Igualmente, un estudio combinado utilizando las frecuencias genotípicas del ADN mitocondrial (ADNmt) en la secuencia del fragmento del gen citocromo-oxidasa c subunidad I, COI, (Folmer *et al.*, 1994), del cual existe un número creciente de información sobre la variación inter e intraespecífica. De acuerdo a Brown (1985), el fragmento COI parece estar entre los genes codificados de proteínas más conservadoras en el genoma mitocondrial de los animales. El análisis de la secuenciación del fragmento COI ha revelado la estructura genética de poblaciones de invertebrados marinos como copépodos (Burton y Lee, 1994) y de erizos marinos (Palumbi, 1996). El presente trabajo constituye el primer estudio multidisciplinario ó integral de una especie de copépodo restringida a un cuerpo de agua costero.

I.3. Objetivos y Metas

I.3.1. Objetivos

1. Caracterización genética de las poblaciones de *Acartia californiensis* en el Pacífico Nororiental.
2. Determinar los posibles efectos ambientales sobre la variabilidad genética de las poblaciones estudiadas.
3. Estimar el grado de diferenciación genética interpoblacional.
4. Determinar el grado de estructuración genética de las poblaciones lo largo de las localidades donde se encuentra.

I.3.2. Metas

1. Caracterizar genéticamente las poblaciones de *Acartia californiensis* en las localidades donde ha sido reportada, tanto por la técnica de electroforesis de alozimas como por ADN mitocondrial por la secuenciación por PCR del gen citocromo-c-oxidasa subunidad I (COI).

I.4. Hipótesis

1. Existe una diferenciación genética a nivel de alozimas y ADNmt entre las poblaciones de *Acartia californiensis* en la costa del Pacífico Nororiental.
2. Existe una evolución común de las poblaciones de *Acartia californiensis* en el Pacífico Nororiental.

3. Las poblaciones de *Acartia californiensis* se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg en sus frecuencias genéticas en función de los procesos estocásticos y determinísticos.

4. Es probable que *Acartia californiensis* tenga una alta variabilidad genética en función de sus características biológicas y de la interacción del medio ambiente.

1.5. Área de Estudio

El área de estudio está localizada entre los $\sim 24^{\circ}10' N$ $-110^{\circ}19' O$ a $\sim 44^{\circ}30' N$ $-124^{\circ}01' O$, en la costa nororiental del Océano Pacífico, abarcando los estados de Oregon y California en EE.UU., y Baja California y Baja California Sur en México (**Figuras 1.2 y 1.3**). Las localidades y las fechas (1998) en que se hicieron los muestreos respectivos fueron: Yaquina Bay (agosto 5); San Francisco Bay (agosto 7); Marina del Rey (agosto 15); San Pedro Bay (agosto 14); Sunset Beach Marina (septiembre 27); Newport Bay (septiembre 26); Mission Bay (septiembre 30); Estero Punta Banda (octubre 10); Bahía San Quintín (julio 19); Laguna de Guerrero Negro (julio 18); Laguna Ojo de Liebre (julio 17), y Ensenada de La Paz (julio 13) [**Figuras 1.4 – 1.6**].

Todos los lugares muestreados son cuerpos de agua costeros como esteros, estuarios y lagunas costeras en donde ha sido reportada la existencia de *Acartia californiensis*, y que además tienen en común el ser ecológica, económica y recreacionalmente importantes. Son ecosistemas que contienen algunas de las comunidades naturales biológicamente más

diversas cuya abundancia y ensamblaje de especies de plantas y animales se atribuye a la estrecha interrelación con los recursos localizados dentro y fuera de la costa (Chapman, 1977; Day, 1989).

Dentro de la costa son extensos sistemas donde confluyen importantes descargas de agua dulce, aportan una notable cantidad de nutrientes y proveen un hábitat para varias especies marinas. Fuera de la costa están fuertemente influenciados por la dinámica del Sistema de la Corriente de California y por fenómenos de surgencias que contribuyen con nutrientes esenciales a las áreas costeras, soportando una extensa cadena alimenticia (Leet *et al.*, 2001).

Son cuerpos de agua con una dinámica oceanográfica muy importante. Día a día se presentan importantes escurrimientos mareales y flujos de agua dulce que crean condiciones de salinidad altamente cambiantes. Las numerosas partes someras también presentan altas variaciones de temperatura. Las corrientes en los canales pueden alcanzar velocidades de varios nudos, creando áreas de fondos blandos donde los organismos están altamente adaptados para sobrevivir (Reid y Wood, 1976).

De acuerdo a Trinast (1975) y Dadswell (1975), la distribución agregada del plancton en los cuerpos estuarinos es resultado de las corrientes mareales y los giros que producen patrones de circulación de escala fina asociados a la topografía del fondo.

Debido a la complejidad y fragilidad de los ecosistemas estuarinos, su proximidad a la intensa actividad y desarrollo humano los ponen en alto

riesgo; el drenaje, los desechos industriales, el relleno de marismas y planicies mareales los están degradando exponencialmente. Existe también una gran cantidad de ejemplos documentados de especies no nativas que son introducidas a estos cuerpos costeros por medio de descargas de aguas de cisternas de embarcaciones que llegan de otros lugares las cuales se reproducen en grandes cantidades y compiten por hábitat y alimento con las especies nativas (Leet *et al.*, 2001).

I.6. Referencias

- Ambler, J. W., Cloern, J. E. y Hutchinson, A. (1985). Seasonal cycles of zooplankton from San Francisco Bay. *Hydrobiol.*, 129: 177-197.
- Badillo-Padilla, M. M. (1996). Variación de la tasa de pastoreo de *Acartia californiensis* Trinast (Copepoda: Calanoida) en el Estero Punta Banda, B. C., México. Tesis de Maestría. Fac. Ciencias Marinas, UABC.
- Bowman, T. E. (1971). The distribution of calanoid copepods off the southeastern United States between Cape Hatteras and southern Florida. *Smithson. Contrib. Zool.*, 96:1-58.
- Brinton, E., Fleminger, A. y Siegel-Causey, P. (1986). The temperate and tropical planktonic biotas of the Gulf of California. *CalCOFI Rep.*, 27: 228-266.
- Brown, W. M. (1985). The mitochondrial genome of animals. En: *Molecular Evolutionary Genetics*. R. J. MacIntyre (ed.). Plenum Press, New York, pp. 95-130.
- Burton, R. S. y Lee, B.-N. (1994). Nuclear and mitochondrial gene genealogies and allozyme polymorphism across a major phylogeographic break in the copepod *Tigriopus californicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5197-5201.

- Castel, J. y Courties, C. (1982). Composition and differential distribution of zooplankton in Arcachon Bay. *J. Plankton Res.*, 4: 417-433.
- Chapman, V. J. (1977). *Wet Coastal Ecosystemas*. Elsevier Scientific, N. Y.
- Dadswell, M. J. (1975). Some notes on shoaling behavior and growth of *Mysis gaspensis* (Mysidaceae) in a Newfoundland estuary. *Can. Jour. Zool.*, 53: 374-377.
- Dawson, J. K. (1980). Recognition and occurrence of *Acartia californiensis* and *Acartia tonsa* in the Los Angeles-Long Beach Harbors and Marina del Rey, California. 2nd. Winter Meeting, ASLO, USC, Los Angeles, CA, Jan. 31-Feb. 4, 7 pp.
- Dawson, J. K. y Knatz, G. (1980). Illustrate key to the planktonic copepods of San Pedro Bay, California, Tech. Rep. Allan Hancock Found, N. S. 2.
- Day, J. W. (1989). *Estuarine Ecology*. John Wiley, N. Y.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3: 294-299.
- Frolander, H. F., Miller, C. B., Flynn, M. J., Myers, S. C. y Zimmerman, S. T. (1973). Seasonal cycles of abundance in zooplankton populations of Yaquina Bay, Oregon. *Mar. Biol.*, 21: 277-288.
- Humes, A. G. (1994). How many copepods? En: *Ecology and Morphology of Copepods*. Proceedings of the 5th. International Conference on Copepoda, Baltimore, USA, June 6-13, 1993. F. D. Ferrari y B. P. Bradley (eds.), Kluwer Academic Publishers, *Hydrobiol.*, 292/293: 1-7.
- Huys, R. y Boxshall, G. A. (1991). *Copepod evolution*. Ray Soc., London, England: 1-468.
- Jiménez-Pérez, L. C. y Lara-Lara, J. R. (1990). Distribución de biomasa y estructura de la comunidad del zooplancton en el Estero Punta Banda. *Ciencias Marinas*, 16(1): 35-48.

- Johnson, J. K. (1974). The dynamics of an isolated population of *Acartia tonsa* (Copepoda) in Yaquina Bay, Oregon. M. Sc. Thesis. Oregon State Univ., Corvallis, Oregon.
- Johnson, J. K. (1980). Effects of temperature and salinity on production and hatching of dormant eggs of *Acartia californiensis* (Copepoda) in a Oregon estuary. Fish. Bull., 77: 567-584.
- Johnson, J. K. (1981). Population dynamics and cohort persistence of *Acartia californiensis* (Copepoda: Calanoida) in Yaquina Bay, Oregon. Ph.D. Thesis, Oregon State University, Corvallis, Oregon.
- Johnson, J. K. y Miller, C. B. (1974). Dynamics of isolated plankton populations in Yaquina Bay, Oregon. Proc. 3rd. Annual Tech. Conf. Estuaries Pac. Northwest. Oregon State Univ. Eng. Exp. Stn. Circ., 46: 27-35.
- Leet, W. S., Dewees, C. M., Klingbeil, R. y Larson, E. S. (2001). California's Living Marine Resources: A Status Report. California Department of Fish and Game.
- Méndez-Lanz, R. M. (1988). Abundancia y distribución del zooplancton en el Estero de Punta Banda, Baja California (diciembre 1986 - mayo 1987). Tesis de Oceanólogo, Fac. Ciencias Marinas, UABC.
- Miller, C. B. (1983). The zooplankton of estuaries. En: Ecosystems of the World. Vol. 26: Estuaries and Enclosed Seas. B. H. Ketchum (ed.). Elsevier Scientific Publishing Co., New York, pp. 103-149.
- Miller, C. B., Johnson, J. K. y Heinle, R. (1977). Growth rules in the marine copepod genus *Acartia*. Limnol. Oceanogr., 22: 326-334.
- Morales-Zamorano, L. A., Cajal-Medrano, R, Orellana-Cepeda, E. y Jiménez-Pérez, L. C. (1991). Effect of tidal dynamics on a planktonic community in a coastal lagoon of Baja California, Mexico. Mar. Ecol. Prog. Ser., 78: 229-239.
- Pace, S. D. (1978). Distribution, abundance and rates of fecundity and growth of *Acartia californiensis* Trinast (Copepoda) in Elkhorn Slough, California. M. Sc. Thesis, San Jose State University, Calif.

- Paffenhöfer, G. -A. y Stearns, D. E. (1988). Why is *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) restricted to nearshore environments? Mar. Ecol. Prog. Series. 42:33-38.
- Palumbi, S. R. (1996). Microspatial genetic structure and speciation in marine taxa with high dispersal abilities. En: J. D., Ferraris y S. R., Palumbi (eds.), Molecular Zoology, Advances, Strategies and Protocols, Wiley-Liss, New York, pp. 101-117.
- Raymont, J. E. G. (1983). Plankton and Productivity in the Oceans. 2nd. Ed., Oxford: Pergamon.
- Reid, G. K. y Wood, R. D. (1976). Ecology of Inland Waters and Estuaries. D. Van Nostrand. N. Y.
- Soule, D. F. y Oguri, Nf. (1980a). The Marine Environment in Los Angeles and Long Beach Harbors During 1978. Marine Studies of San Pedro Bay, California. Part 17: A Report for the City of Los Angeles, Department of Public Works, the Port of Long Beach Division of Environmental Management, and the Port of Los Angeles Environmental Analysis Office. Allan Hancock Foundation and USC-IMCS pp. 277-278 (especially).
- Soule, D. F. y Oguri, M. (1980b). The Marine Environment of Marina del Rey, California, A Baseline Survey. July 1976 to June 1979. Part 18: A Report to Department of Small Craft Harbors Country of Los Angeles. Marine Studies of San Pedro Bay, California. Allan Hancock Foundation and USC-IMCS pp.290-294 (especially).
- Steuer, A. (1923). Bausteine zu einer Monographie der Copepodengattung *Acartia* Arb. Zool. Inst. Univ. Innsbruck, 1: 89-148.
- Subbaraju, R. C. (1967). Variation of development time of *Acartia* (Copepoda) with latitude. Curr. Sci., 1: 18-19.
- Trinast, E. M. (1975). Tidal currents and *Acartia* distribution in Newport Bay, California. Est. Coast. Mar. Sci., 3: 165-176.

- Trinast, E. M. (1976). Preliminary note on *Acartia californiensis*, a new calanoid copepod from Newport Bay, California. *Crustaceana*, 31: 54-58.
- Trujillo-Ortiz, A. (1986). Life cycle of the marine calanoid copepod *Acartia californiensis* Trinast reared under laboratory conditions. *CalCOFI Rep.*, 27: 188-204.
- Trujillo-Ortiz, A. (1990). Porcentaje de eclosión, producción de huevos y tiempo de desarrollo de *Acartia californiensis* Trinast bajo condiciones de laboratorio. *Ciencias Marinas*, 16(1): 1-22.
- Trujillo-Ortiz, A. y Arroyo-Ortega, J.E. (1991). Análisis de la mortalidad y esperanza de vida de *Acartia californiensis* (Copepoda: Calanoida) bajo condiciones de laboratorio. *Ciencias Marinas*, 17(4): 11-18.
- Trujillo-Ortiz, A., Burton, R. S., de la Rosa-Vélez, J. y Correa-Sandoval, F. (1995). Variación genética en dos poblaciones del copépodo calanoide marino *Acartia californiensis* Trinast. *Ciencias Marinas*, 21(1): 39-58.
- Trujillo-Ortiz, A., Badillo-Padilla, M. M. y Castro-Castro, N. (1996). Variación de la tasa de pastoreo de *Acartia californiensis* Trinast (Copepoda: Calanoida) en el Estero Punta Banda, B. C., México. Resumen IX Simposium Internacional de Biología Marina. La Paz, Baja California Sur, 18-22 noviembre de 1996.
- Trujillo-Ortiz, A., Burton, R. S., de la Rosa-Vélez, J. y Correa-Sandoval, F. (1999). Interbreeding between two populations of *Acartia californiensis* Trinast (Copepoda: Calanoida): a laboratory study. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 79(5): 1111-1113.
- Uye, S. (1982). Population dynamics and production of *Acartia clausi* Giesbrecht (Copepoda: Calanoida) in inlet waters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 57: 55-83.
- Uye, S. y Fleminger, A. (1976). Effects of various environmental factors on eggs development of several species of *Acartia* in southern California. *Mar. Biol.*, 38:253-262.

Zimmerman, S. T. (1972). Seasonal succession of zooplankton populations in two dissimilar marine embayments on the Oregon coast. Ph. D. Thesis, Oregon State Univ., Corvallis, 212 pp.

I.7. Figuras y Tablas

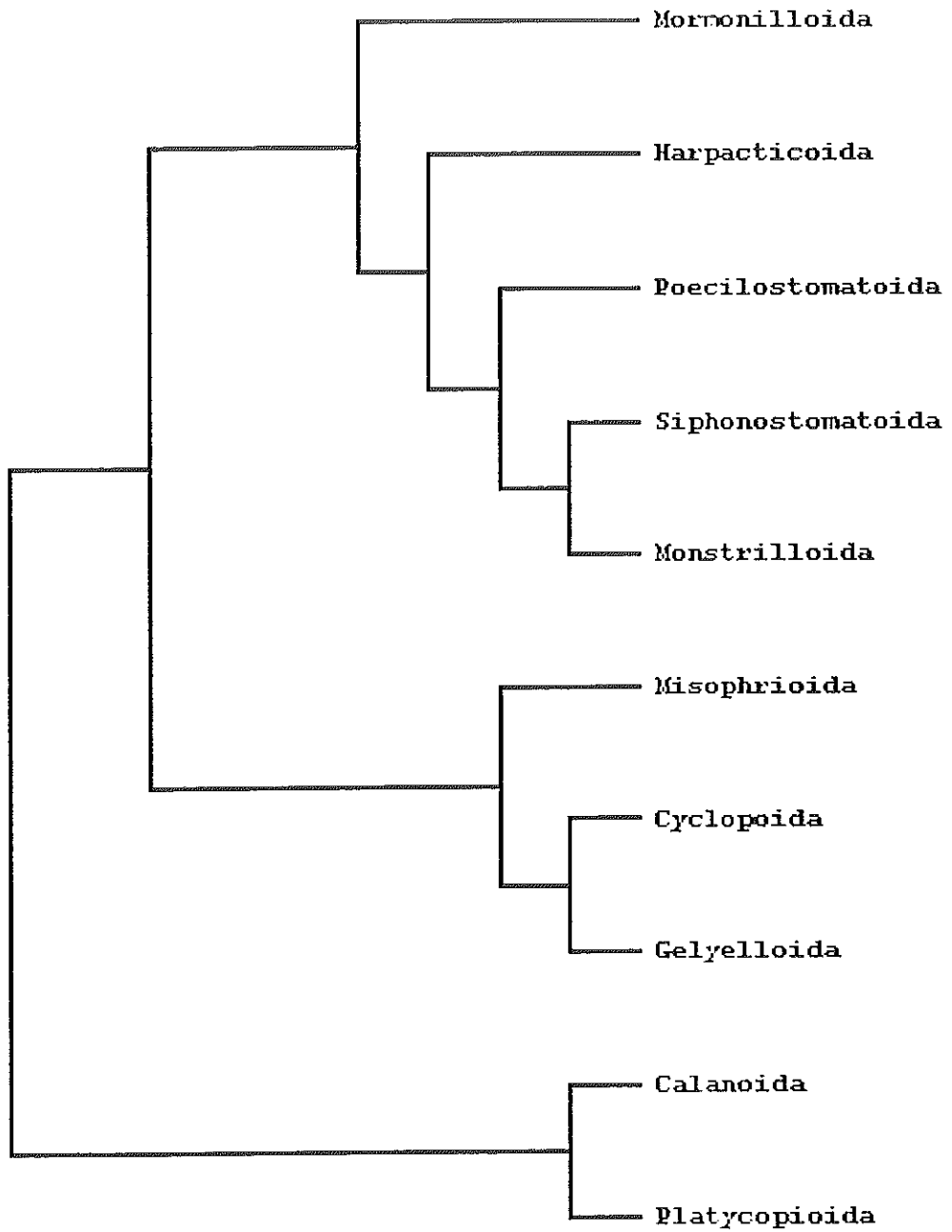


Figura I.1. Relación filogenética del grupo de los copépodos (Huys y Boxshall, 1991).

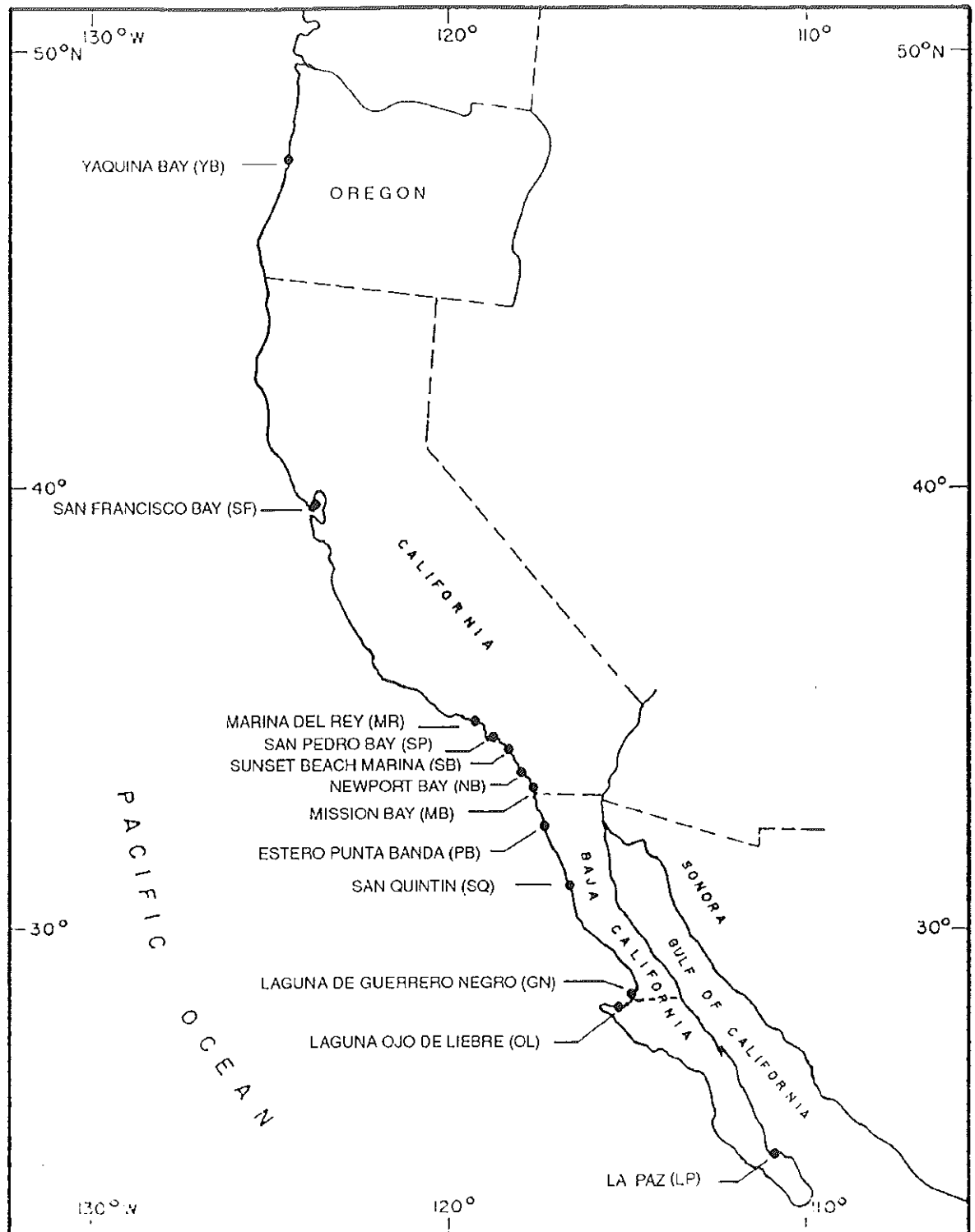


Figura 1.2. Localización de los lugares muestreados del copépodo calanoide *Acartia californiensis* en la costa nororiental del Pacífico para análisis genéticos por alozimas.

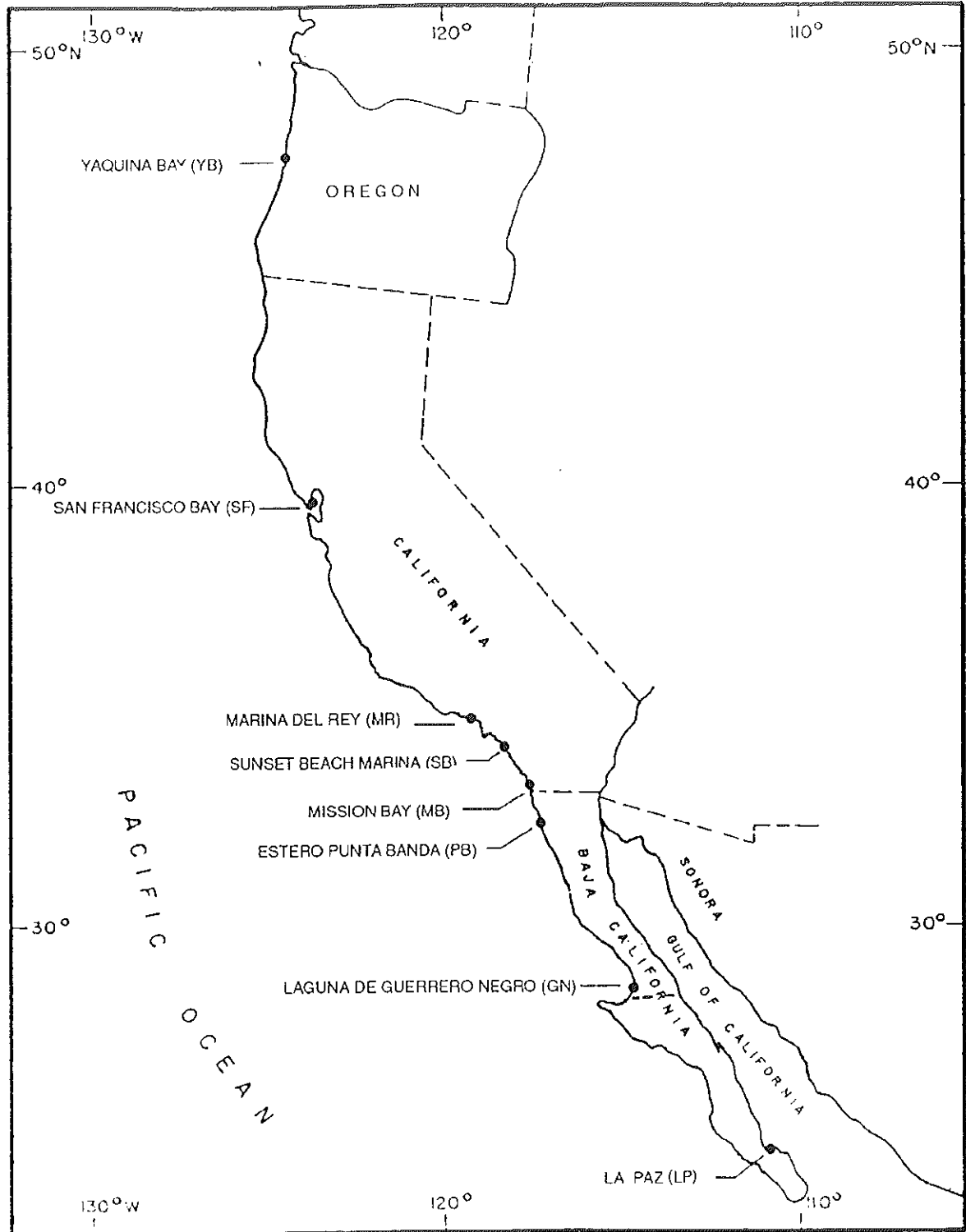


Figura 1.3. Localización de los lugares muestreados del copépodo calanoide *Acartia californiensis* en la costa nororiental del Pacífico para análisis genéticos por secuenciación del fragmento del gen ADN mitocondrial citocromo oxidasa c subunidad I.

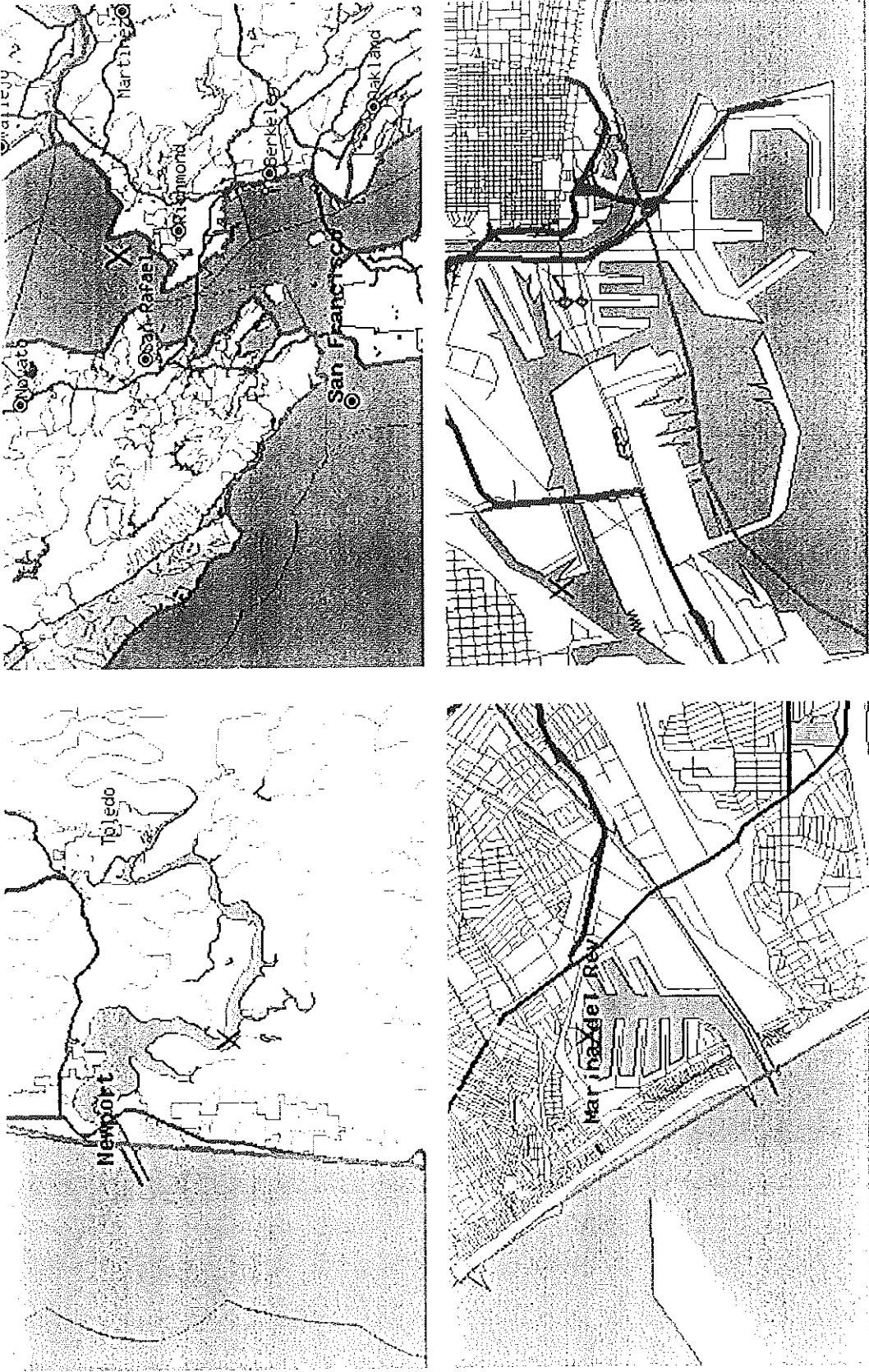


Figura 1.4. Detalle y ubicación puntual de los arrastres zooplancónicos (X). En el sentido de las manecillas del reloj se muestra: Yaquina Bay, Oregon; San Francisco Bay; Marina del Rey; y San Pedro Bay en California, EE.UU.

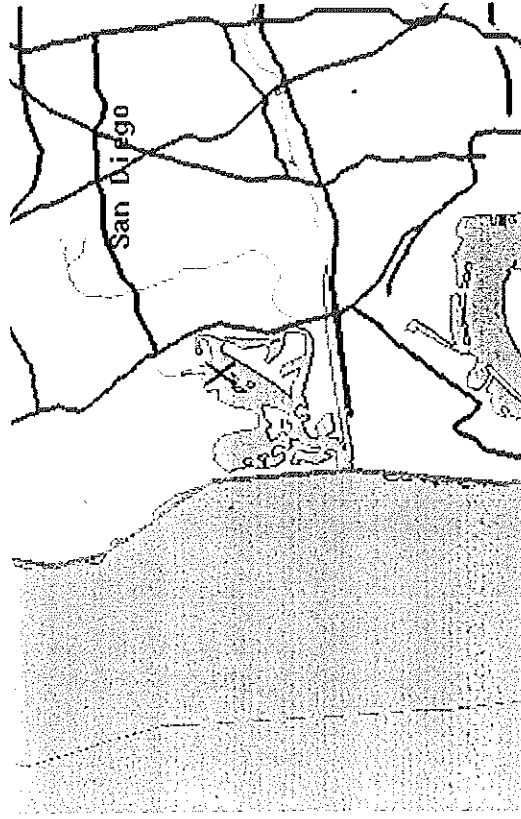
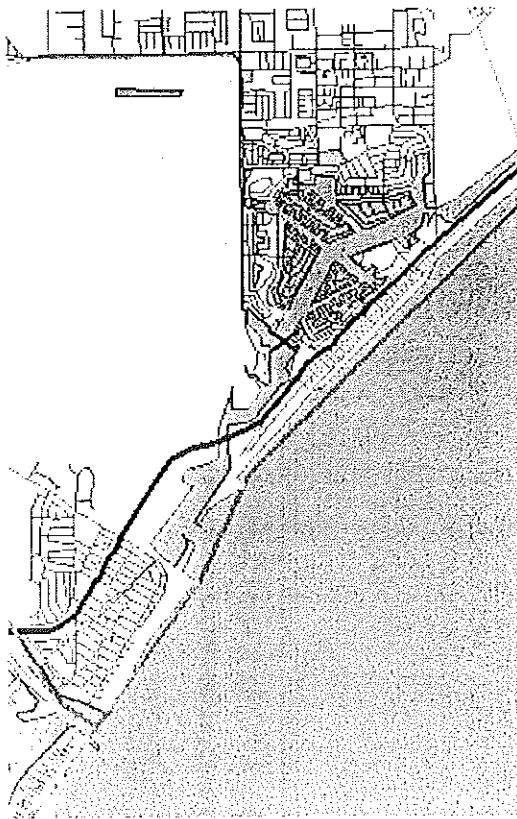
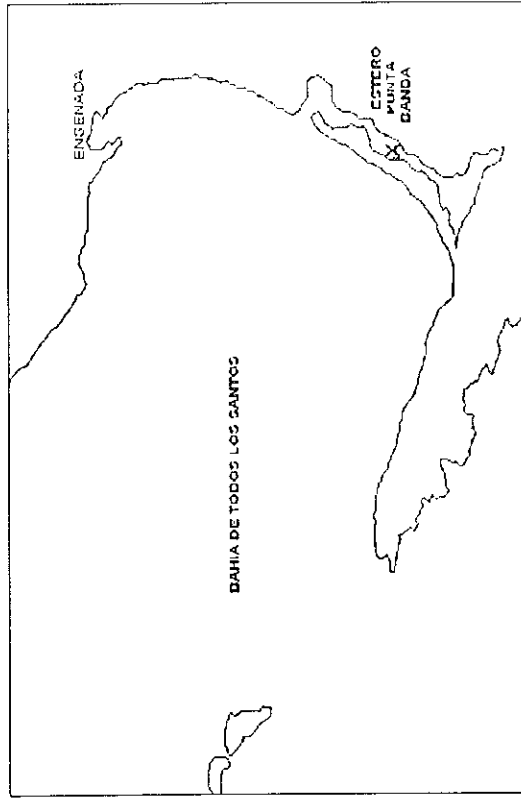


Figura 1.5. Detalle y ubicación puntual de los arrastres zooplancónicos (X). En el sentido habitual se muestra: Sunset Beach Marina, Newport Bay y Mission Bay en California, EE.UU., y Estero Punta Banda, Baja California, México.

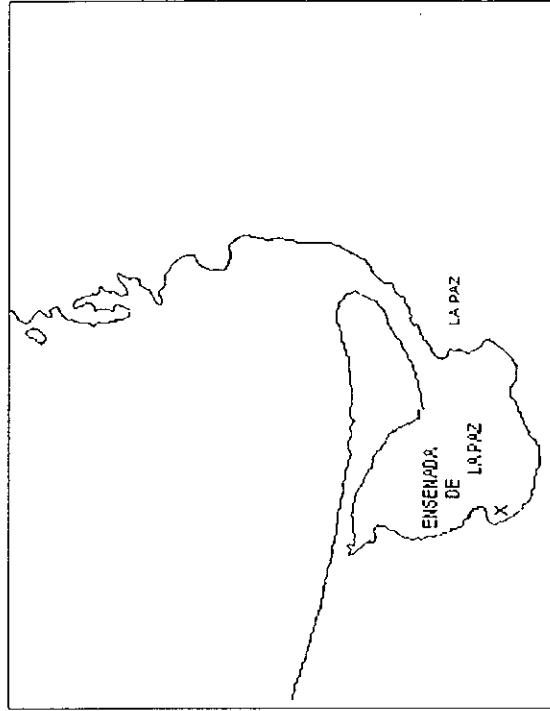
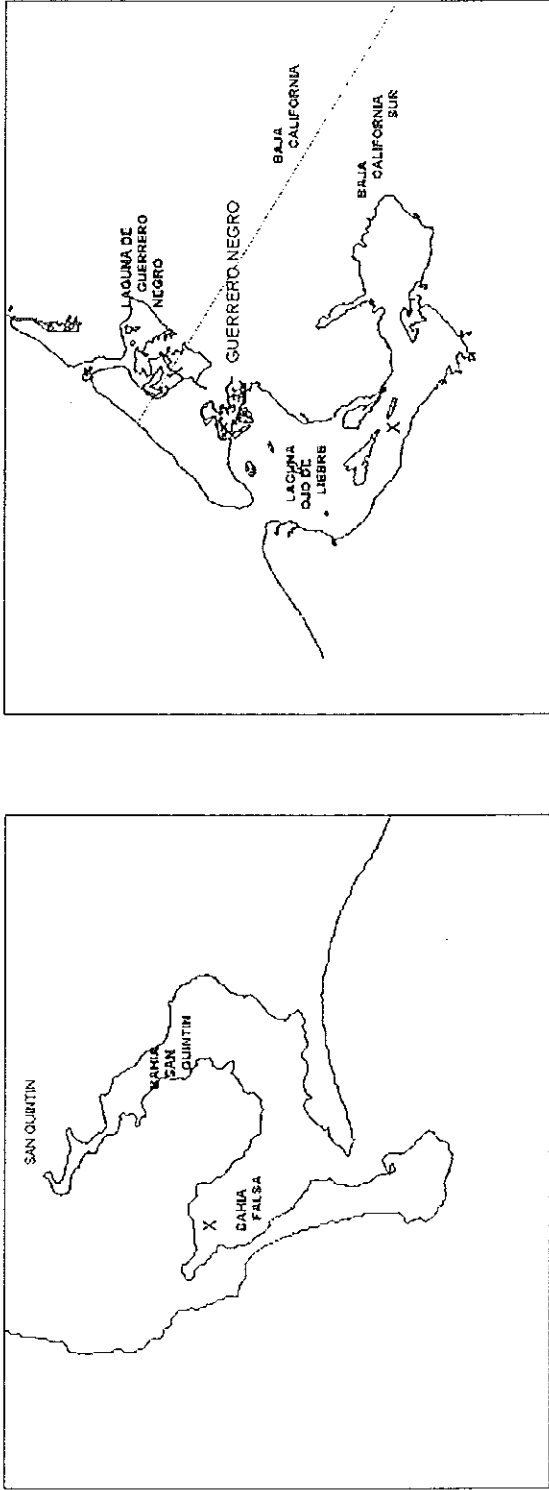


Figura 1.6. Detalle y ubicación puntual de los arrastres zooplanctónicos (X). En el sentido habitual se muestra: Bahía de San Quintín y Laguna de Guerrero Negro, Baja California, y Laguna Ojo de Liebre y Ensenada de La Paz, Baja California Sur, México.

Tabla 1.1. Relación de las 96 especies del género *Acartia* descritas hasta el año 2000. En negritas se indica la especie bajo estudio.

Orden	Familia	Género	Especie	Subespecie	Fecha
Calanoida	Acartiidae	<i>Acartia</i>	<i>adriatica</i>		1910
			<i>africana</i>		1915
			<i>ambionensis</i>		1907
			<i>asymmetrica</i>		1964
			<i>australis</i>		1936
			<i>bacorehuisensis</i>		1986
			<i>baylyi</i>		1972
			<i>bermudensis</i>		1911
			<i>bifilosa</i>		1881
				<i>inermis</i>	1929
				<i>intermedia</i>	1885
				<i>tonsagiesbrechti</i>	1910
				<i>bilobata</i>	1970
				<i>bispinosa</i>	1907
				<i>bowmani</i>	1976
				<i>californiensis</i>	1976
				<i>centrura</i>	1889
				<i>chilkaensis</i>	1919
				<i>sittangi</i>	1934
				<i>clausi</i>	1889
				<i>gaboonensis</i>	1894
				<i>danae</i>	1889
				<i>denticomis</i>	1883
				<i>discaudata</i>	1882
				<i>mediterranea</i>	1934
				<i>dubia</i>	1893
				<i>dweepi</i>	1978
				<i>ensifera</i>	1899
				<i>enzoi</i>	1974
				<i>erythraea</i>	1889
				<i>brehmi</i>	1923
				<i>valdiviae</i>	1924
				<i>fancetti</i>	1992
				<i>fariai</i>	1945
				<i>floridana</i>	1948
				<i>forcipata</i>	1897
				<i>fossae</i>	1927
				<i>giesbrechti</i>	1894
				<i>gracilis</i>	1887
				<i>grani</i>	1904
				<i>gravelyi</i>	1917
				<i>hamata</i>	1950
				<i>hongji</i>	2000
				<i>hudsonica</i>	1926
				<i>iseana</i>	1956
				<i>italica</i>	1910
				<i>japonica</i>	1940
				<i>jilletti</i>	1976
				<i>josephinae</i>	1974
				<i>kempi</i>	1914
				<i>keralensis</i>	1969
				<i>latisetosa</i>	1873
				<i>laxa</i>	1852
				<i>lefevreae</i>	1976
				<i>levequei</i>	1964
				<i>lilljeborgii</i>	1889
				<i>limpida</i>	1849

<i>longipatella</i>		1974
<i>longiremis</i>		1853
	<i>spineremis</i>	1976
<i>longisetosa</i>		1914
<i>macropus</i>		1900
<i>major</i>		1919
<i>margalefi</i>		1976
<i>mediterranea</i>		1909
<i>minor</i>		1919
<i>nana</i>		1914
<i>natalensis</i>		1974
<i>negligens</i>		1849
<i>omorii</i>		1976
<i>pacifica</i>		1915
	<i>mertoni</i>	1923
<i>pietschmanni</i>		1912
<i>plumosa</i>		1894
<i>ransoni</i>		1954
<i>remivagantis</i>		1946
<i>sarokus</i>		1994
<i>shayyai</i>		1968
<i>sewelli</i>		1934
<i>simplex</i>		1905
<i>sinensis</i>		1963
<i>sinjiensis</i>		1940
<i>southwelli</i>		1914
<i>spinata</i>		1911
<i>spinicauda</i>		1889
<i>steueri</i>		1936
<i>tedae</i>		1976
<i>tokiokai</i>		1942
<i>tonsa</i>		1849
	<i>cryophylla</i>	1963
<i>tortaniformis</i>		1912
<i>tranteri</i>		1976
<i>tropica</i>		1987
<i>tsuensis</i>		1956
<i>tumida</i>		1920
<i>verrucosa</i>		1888

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN DE *Acartia californiensis* POR MEDIO DEL ANÁLISIS ALOZIMÁTICO

II.1. Introducción

Uno de los tópicos centrales de la biología moderna es la relación del grado de polimorfismo y de variabilidad genética entre las poblaciones. El medio ambiente marino provee de excelentes oportunidades para el estudio de la interrelación entre la genética y la ecología. Durante los últimos 30 años la aplicación de técnicas genéticas bioquímicas al estudio de poblaciones geográficamente separadas de invertebrados, tanto marinos como estuarinos, ha incrementado significativamente nuestro entendimiento de la diferenciación poblacional en el medio ambiente marino (Gooch, 1975; Battaglia y Beardmore, 1978; Levinton, 1980, 1982; Burton y Feldman, 1982; Burton, 1983); de hecho, los estudios relacionados con la variabilidad genética y el medio ambiente de organismos marinos empezaron desde hace mucho tiempo (Battaglia *et al.*, 1978).

La técnica de electroforesis en gel ha sido ampliamente usada para el estudio de la discriminación de especies bioquímicas (Bulnheim y Scholl, 1981) y, frecuentemente, puede dar una idea aproximada ó precisa de la estructura genética locus por locus de poblaciones coespecíficas de organismos que no fácilmente pueden ser cultivados en el laboratorio para estudios formales de genética (Burton, 1983). Como una extensión al análisis genético bioquímico, los datos de la frecuencia de alozimas de loci seleccionados se utilizan para examinar los patrones de la variación genética entre poblaciones naturales con un amplio rango geográfico de distribución (Bulnheim y Scholl, 1981).

De acuerdo a Mitton (1997), en los animales generalmente la energía se almacena en el glucógeno que luego es catalizado por la glucólisis, la vía alterna fosfato de pentosa y el ciclo de Krebs del ácido cítrico para generar ATP. Estas rutas constituyen la respiración, siendo aquí donde es utilizada en los costos metabólicos rutinarios. Aunque el número de enzimas utilizadas excede a 1,000, se requieren aproximadamente 30 para catabolizar el glucógeno a los productos finales CO_2 y H_2O . Así, muchas de las enzimas utilizadas en estudios genéticos poblacionales participan en esas rutas (**Figura 2.1**).

En promedio, la mayoría de las especies son polimórficas en un 30 a un 50% de las enzimas ensayadas (Powell, 1975; Nevo, 1978), por lo que aproximadamente de 12 a 20 de las enzimas que

participan en las rutas metabólicas mencionadas anteriormente deberían de ser polimórficas.

El polimorfismo proteínico ha sido utilizado para determinar el grado de la estructura genética de poblaciones naturales de diversos invertebrados marinos (Burton, 1983). Entre las poblaciones naturales de invertebrados marinos es frecuente observar una extensa diferenciación genética detectada por medio de la electroforesis (Burton, 1986).

II.2. Materiales y Métodos

II.2.1. Origen de las poblaciones

En el presente estudio se analizaron diferentes poblaciones de *Acartia californiensis*, las cuales son: Yaquina Bay, Oregon (YB); San Francisco Bay (SF), Marina del Rey (MR), San Pedro Bay (SP), Sunset Bay Marina (SB), Newport Bay (NB) y Mission Bay (MB), California; Estero Punta Banda (PB), Bahía de San Quintín (SQ) y Laguna de Guerrero Negro (GN), Baja California, y Laguna Ojo de Liebre (OL) y Ensenada de La Paz (LP), Baja California Sur.

II.2.2. Colecta

Las poblaciones de *Acartia californiensis* fueron recolectadas de los lugares bajo estudio por medio de arrastres subsuperficiales utilizando una red estándar de plancton provista con malla Nytex

monofilamentosa de 202 μm de luz de malla con copo de vidrio. Los arrastres se realizaron desde una embarcación inflable tipo Zodiac de 12 pies de eslora con motor fuera de borda de 25 Hp; se lanzó al mar la red la cual estaba sujeta con un cabo por el lado interno de la embarcación, en dirección circular. La duración de los arrastres dependió de la densidad zooplanctónica pero nunca excedió de los 5 min. Los organismos vivos fueron transferidos a hieleras de plástico tipo Thermo que contenían agua de mar del lugar de colecta y mantenidas perfectamente tapadas durante su transporte al laboratorio, donde se dejaron reposar aproximadamente una hora. Después, se sifoneó el material del fondo para eliminar los organismos muertos ó dañados que se precipitaron.

Utilizando el fototactismo positivo que presenta *A. californiensis*, ésta fue separada del resto de los zooplanctones con ayuda de una lámpara de mano con la que se hizo incidir el haz de luz sobre una de las esquinas de la hielera bajo completa oscuridad. Una vez agrupados los copépodos, éstos fueron capturados con vasos de precipitado de 500 ml. Se reconcentraron y se colocaron en cajas de Petri para revisarlos y seleccionarlos bajo el microscopio estereoscópico, de acuerdo a las características morfoanatómicas de los adultos descritas por Trinast (1976), Dawson (1980) y Trujillo-Ortiz (1986).

Se llevó a cabo primero un análisis electroforético preliminar entre las poblaciones de Mission Bay y Estero Punta Banda en el que se separaron 1,100 organismos adultos de ambos sexos, 550 por localidad. Una vez concluido el estudio preliminar, en el cual se mejoraron ó se puso a punto la metodología, se realizó el análisis electroforético definitivo y extensivo a más poblaciones, en el cual, por cada población, se separaron aproximadamente 1,500 individuos adultos hembras y machos distribuyéndolos en grupos de 100. La selección de los copépodos se realizó utilizando sólo la tensión superficial con una microaguja entomológica No. 000 fijada a una delgada varilla de bambú.

II.2.3. Preservación de los organismos

Para el análisis preliminar se usaron individuos vivos sin preservar. En el segundo análisis, una vez hecha la cuidadosa separación individual de los organismos de *Acartia californiensis* de cada una de las poblaciones muestreadas, inmediatamente se congelaron en criotubos que contenían agua de mar filtrada y pasada por UV, y se almacenaron bajo congelación rápida a -196°C en nitrógeno líquido (LN_2); posteriormente se transportaron al laboratorio donde se transfirieron para su conservación en un congelador a -80°C , hasta su análisis posterior.

II.2.4. Homogenización de los organismos

Para la preparación de los individuos utilizados para el análisis de alozimas, éstos fueron usados vivos ó, en su caso, descongelados de manera lenta a baja temperatura, insertando los criotubos en hielo molido. Se tomaron las muestras con una pipeta Pasteur, colocandose éstas en una caja de Petri y, bajo el microscopio estereoscópico, se hizo la selección. Una vez visualizados y corroborada la identificación de los individuos, éstos fueron manipulados con extremo cuidado, utilizando para ello, sólo la tensión superficial con una microaguja entomológica No. 000 fijada a una delgada varilla de bambú. Cada uno de los organismos se colocaron en las depresiones (~6 mm de profundidad y 4.5 mm de diámetro) en placas de teflón que contenían 10 µl de solución para homogenizar el compuesto de tris-ácido bórico- EDTA con pH de 8.9 (9.45 g de tris, 1.2 g de EDTA, 0.6 g de ácido bórico y 1 l de H₂O desionizada); además, contenía 10% de sacarosa y una cuantas gotas de azul de bromofenol. Los organismos se maceraron individualmente en las depresiones con la ayuda de varillas de Plexiglás.

II.2.5. Elaboración del gel de poliacrilamida

La placa de gel consistió en poliacrilamida al 6% p/v (3.98 g de acrilamida, 0.210 g de metileno de bisacrilamida [BIS], 70 mg de

persulfato de amonio [AP], 70 ml de amortiguador trisborato de EDTA a pH 8.9 y 70 μ l de tetrametiletilenediamina [TEMED]). Las placas de gel median ~169 x 117 x 0.8 mm.

II.2.6. Montaje en placas de gel de poliacrilamida

El tejido crudo homogeneizado de cada organismo se extrajo de cada una de las depresiones con una micropipeta y se vació en cada uno de los 25 espacios de ~4 x 10 mm hechos con peines en la parte superior de cada placa de gel.

II.2.7. Sistemas enzimáticos

En el presente estudio se analizaron 15 sistemas enzimáticos. A continuación se indica el sustrato específico para su revelado de acuerdo a modificaciones de Harris y Hopkinson (1977) hechas por Burton (no publicado).

1. **Glutamato-piruvato-transaminasa (GTP):** 10 mg de NADH, 40 mg de α -cetoglutarato, 80 mg de L-alanina, 5 ml de tris HCl (1 M) a pH 8.0, 30 ml de H₂O desionizada, 10 μ l de deshidrogenasa láctica. Se usó papel filtro para cubrir el gel y se visualizó bajo luz UV.
2. **Deshidrogenasa málica (MDH):** 15 mg de NAD, 10 mg de MTT, 5 mg de metosulfato de fenazina (PMS), 40 mg de ácido málico, 5 ml de tris HCl (1 M) a pH 8.0, 150 ml de H₂O desionizada.

3. **Esterasa (EST):** 30 mg de α -naftil-acetato, 30 mg de β -naftil-acetato, 60 mg de Fast Garnet, 4 ml de acetona (para disolver los sustratos), 150 ml de amortiguador de fosfatos (0.1 M) a pH 6.5.
4. **Leucín-aminopeptidasa (LAP):** 25 mg de L-leucina- β -naftilamida, 40 mg de Fast Black K, 4 ml de acetona (para disolver los sustratos), 150 ml de amortiguador de fosfato (0.1 M) a pH 6.5.
5. **Arginina-fosfoquinasa (APK):** 15 mg de fosfato de arginina, 10 mg de ADP, 100 mg de glucosa (dextrosa), 8 mg de NADP, 8 mg de MTT, 5 mg de PMS, 5 ml de tris HCl (1 M) a pH 8.0, 2 ml de $MgCl_2$ hexahidratado (0.2 M), 150 ml de H_2O desionizada, 10 μ l de hexoquinasa. Se tiñó en la oscuridad.
6. **Fosfoglucomutasa (PGM):** 8 mg de NADP, 5 mg de PMS, 10 mg de MTT, 100 mg de glucosa-1-fosfato, 5 ml de tris HCl (1 M) a pH 8.0, 2 ml de $MgCl_2$ (0.2 M), 150 ml de H_2O desionizada, 10 μ l de G-6-PDH. Se tiñó en la oscuridad.
7. **Glutamato-oxaloacetato-transaminasa (GOT):** 40 mg de α -cetoglutarato, 10 mg de NADH, 8 mg de L-ácido aspártico, 5 ml de tris HCl (1 M) a pH 8.0, 30 ml de H_2O desionizada, 10 ml de deshidrogenasa málica. Se usó papel filtro para cubrir el gel y se visualizó bajo luz UV.
8. **Hexoquinasa (HK):** 100 mg de glucosa, 100 mg de fructosa, 40 mg de ATP, 10 mg de NADP, 8 mg de MTT, 5 mg de PMS, 5 ml

de tris HCl (1 M) a pH 8.0, 2 ml de MgCl₂ (0.2 M), 150 ml de H₂O desionizada, 10 µl de G-6-PDH. Se tiñó en la oscuridad.

9. **Enzima málica (ME):** 60 mg de L-ácido málico, 8 mg de NADP, 8 mg de MTT, 4 mg de PMS, 5 ml de tris HCl (1 M) a pH 8.0, 2 ml de MgCl₂ (0.2 M), 150 ml de H₂O desionizada. Se tiñó en la oscuridad.
10. **Fosfoglucosa-isomerasa (PGI):** 8 mg de NADP, 5 mg de PMS, 10 mg de MTT, 35 mg de fructosa-6-fosfato, 5 ml de tris HCl (1 M) a pH 8.0, 2 ml de MgCl₂ hexahidratado (0.2 M), 150 ml de H₂O desionizada, 10 µl de G-6-PDH. Se tiñó en la oscuridad.
11. **Fumarato-hidratasa=fumarasa (FH = FUM):** 5 ml de tris HCl (1 M) a pH 8.0, 100 mg de fumarato de sodio, 20 mg de NAD, 10 mg de MTT, 5 mg de PMS, 10 µl de deshidrogenasa málica, 150 ml de H₂O desionizada. Se tiñó en la oscuridad.
12. **Glutamato-deshidrogenasa (GDH):** 100 ml de amortiguador sodio fosfato (0.05 M) a pH 7.1, 30 mg NAD, 5 mg MTT, 5 mg PMS, 10 mg ADP, 1 mg P5P (piridoxal-5-fosfato), 1 g de glutamato, 50 ml de H₂O desionizada.
13. **Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH):** 5 ml de tris HCl (1 M) a pH 8.0, 8 mg de NADP, 8 mg MTT, 5 mg PMS, 2 ml de MgCl₂ (0.2 M), 50 mg de glucosa-6-fosfato, 150 ml de H₂O desionizada. Se tiñó en la oscuridad. Se pusieron 5 mg de NADP sobre la solución del amortiguador.

14. **Isocitrato-deshidrogenasa (IDH):** 60 ml de tris HCl (1 M) a pH 8.0, 2.5 ml de solución NADP/NBT/PMS (0.4% de NADP, 0.4% de azul de nitrotetrazolium, 0.1% de PMS), 1 ml de $MgCl_2$ al 1%, 100 ml de ácido isocítrico.

15. **6-fosfogluconato-deshidrogenasa (6PGDH):** 50 ml de tris HCl (0.1 M) a pH 8.0, 2.5 ml de solución NADP/NBT/PMS, 35 mg ácido 6-fosfogluconico.

II.2.8. Sistema amortiguador

Para el análisis de los sistemas enzimáticos, se aplicó sólo un sistema amortiguador, trisborato de EDTA a pH de 8.9 (9.45 g de tris, 1.2 g de EDTA, 0.6 g de ácido bórico y 1 l de H_2O desionizada), el cual se utilizó en los depósitos de los electrodos en las cámaras electroforéticas.

II.2.9. Electroforesis

La microelectroforesis fue vertical; las condiciones en las que se llevó a cabo fueron a 120 V y 7°C. Los tiempos para los ensayos de los sistemas enzimáticos fueron 2 h para EST y LAP; 3 h para FUM, PGI, GOT, ME y APK; 4 h para PGM, HK, GPT y MDH.

II.2.10. Análisis y procesamiento de los datos

En cada gel se registró el alelo más común de cada locus, designado como el alelo 100. Los otros alelos se determinaron

numéricamente, de acuerdo a la distancia recorrida respecto al alelo 100. Una vez procesados los zimogramas, los datos se analizaron empleando el software BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1989) en la opción 1 (designación de genotipos individuales A, B, C, etc., iniciando con el que migró la mayor distancia desde el origen al ánodo); GENETIX (Belkhir, 2001); FSTAT (Goudet, 1999), y GENEPOP (Raymont y Rousset, 1995). Con estos programas se obtuvieron los estimadores genéticos más importantes como el número promedio de alelos por locus (n_a), proporción de individuos heterocigóticos (H) y proporción de loci polimórficos al nivel $P_{0.95}$. Se cuantificó la distancia genética de Nei (1978) y si están en equilibrio de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de χ^2 (Sokal y Rohlf, 1981), a la cual se aplicó la corrección de Levene (1949) para muestras pequeñas. Ayala y Kiger (1984) escribieron un excelente texto donde presentan y explican los estimadores genéticos utilizados en la presente investigación para procesar los datos obtenidos en los zimogramas.

Para encontrar una posible relación entre los datos oceanográficos registrados en cada una de las localidades *in situ* ($T^{\circ}\text{C}$, $\text{S}^{\circ}/_{\text{oo}}$ y $\text{O}_2 \text{ ml}^{-1}$) y las frecuencias alélicas y genotípicas de las poblaciones se usó el análisis de correlación canónica por el paquete STATISTICA para Windows.

Con el fin de determinar una posible asociación entre la distancia genética y la distancia geográfica entre las localidades estudiadas se aplicó la prueba de Mantel usando el paquete GENETIX (Belkhir, 2001), de acuerdo a las premisas establecidas por Mantel (1967), Manly (1985) y Sokal y Rohlf (1995).

II.3. Resultados

II.3.1. Análisis preliminar entre dos poblaciones cercanas

En relación al análisis preliminar, *Acartia californiensis* reveló patrones de bandeo (zimogramas) confiables a través de la microelectroforesis vertical en placas de gel de poliacrilamida, para seis sistemas enzimáticos. La variación de *A. californiensis* fue monomórfica para siete loci: EST-1, LAP-1, APK-1, APK-2, GOT-1, GOT-2 y ME-1; y polimórfica sólo para PGI-1 (Tabla 2.1). Aunque se encontraron en total diez alelos en PGI-1, no todos se presentaron en las dos poblaciones estudiadas. Respecto a las frecuencias alélicas entre ambas poblaciones (Tabla 2.1), PGI-1 reveló que el alelo más común fue C; sin embargo, se encontraron alelos en el Estero Punta Banda (A, B, G y E) que no se presentaron en Mission Bay, donde, a su vez, hubo otros (D, F, H, I y J) que no se encontraron en Punta Banda. Con excepción de los alelos B, C y D, los restantes presentaron una frecuencia menor de 0.1, lo que indica que son alelos raros. El alelo B únicamente se presentó en el Estero Punta Banda, con una frecuencia de 0.16.

El número promedio de alelos por locus fue similar en ambas localidades: 1.5 ± 0.5 para el Estero Punta Banda y 1.6 ± 0.6 para Mission Bay. De los loci analizados en ambas poblaciones, sólo PGI-1 fue polimórfico ($P_{0.95} = 0.125$; **Tabla 2.2**).

La heterocigocidad en el Estero Punta Banda fue 0.060 ± 0.060 y en Mission Bay 0.035 ± 0.035 . Hubo una deficiencia en la heterocigocidad estadísticamente significativa, comparada con el apartamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg esperado en la población de Mission Bay ($D = -0.477$), pero ésta no se dio en el Estero Punta Banda ($D = -0.096$); **Tablas 2.2-4**; $P \leq 0.001$), donde, como se observa, dominó en todos los casos PGI-1.

Las frecuencias genotípicas de PGI-1 en el Estero Punta Banda para los valores agrupados no fueron significativamente diferentes ($P = 0.314$); mientras que en Mission Bay se presentaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$; **Tabla 2.4**).

Los genotipos más frecuentes observados en el Estero Punta Banda fueron CC y BC (**Tabla 2.5**). Parece que el alelo C es más frecuente en condición homocigótica dado que, a excepción del genotipo BC, el resto de los genotipos donde interviene este alelo tienen frecuencias observadas muy bajas ó nulas. Lo inverso sucede con el alelo B donde, en condición homocigótica, su frecuencia observada es de 2; sin embargo, el genotipo BC presenta el valor más alto, 16. En el resto de los genotipos donde participa B, la

frecuencia es baja ó nula. El estadígrafo D (diferencia heterocigótica) para esta población fue de -0.096 , el cual no es estadísticamente significativo ($\chi^2 = 1.013$; $P = 0.314$).

Para Mission Bay, nuevamente el alelo C y el genotipo CC presentan alta frecuencia, y en condición heterocigótica sus frecuencias son bajas. Les sigue en orden de importancia el genotipo homocigoto DD, cuya frecuencia observada es de seis; sin embargo, los heterocigotos donde participa este alelo, con excepción del genotipo DI, están ausentes. El valor D para esta población es de -0.477 , indicando una deficiencia de heterocigotos estadísticamente significativa ($\chi^2 = 16.008$; $P < 0.001$).

El valor de la identidad genética I (Nei, 1978) calculado a partir de las frecuencias alélicas entre las poblaciones es alto, 0.994 ; mientras que la distancia genética D (Nei, 1978) es bajo, 0.006 .

II.3.2. Variabilidad alozimática extensivo a más poblaciones

En el análisis genético de diversas poblaciones naturales de *Acartia californiensis* se revelaron cuatro loci pertenecientes a cuatro sistemas enzimáticos: los loci APK-1, EST-1 y G6P-1 resultaron ser monomórficos y PGI-1 fue polimórfico (Tabla 2.6).

PGI es dimérica, donde el alelo heterocigoto debe presentar tres bandas y los homocigotos sólo una. Aquí, PGI-1 presenta varias bandas satélites las cuales se pueden confundir con los alelos principales, tanto en los homocigotos como en los heterocigotos; sin

embargo, se pueden presentar varios alelos cuando se revisan en un gel simultáneamente muchas poblaciones y cada alelo de ese locus puede tener una migración diferente, pero en cada población no excederá de tres alelos principales. De los seis alelos que mostró PGI-1, el alelo E fue el más común y junto con los alelos D y F, se presentaron en las doce poblaciones estudiadas fluctuando de 0.16-0.69, 0.10-0.50 y 0.03-0.35, respectivamente (**Tabla 2.6**). Los alelos A y B sólo estuvieron presentes (específicos) en San Francisco (0.31 y 0.17), y ausente en el resto de las localidades. El alelo C sólo estuvo ausente en las localidades de Yaquina Bay, Marina del Rey y Newport Bay, variando en el resto de 0.02-0.18.

De acuerdo a la **tabla 2.7** el número promedio global de alelos por locus fue de 1.77 ± 0.77 , con un polimorfismo $P_{0.95} = 0.25$, y una heterocigocidad promedio observada y esperada sin sesgo de 0.98 ± 0.98 y 0.160 ± 0.160 , respectivamente. La prueba estadística Ji-cuadrada mostró ser significativa ($P \leq 0.05$), excepto para las poblaciones de Yaquina Bay y Estero Punta Banda.

La heterocigocidad de PGI-1 mostró una fijación F_{IS} de Wright que varió de $-0.124 - 0.807$ y un valor D de Selander $-0.808 - 0.166$, la cual no fue significativa sólo para Yaquina Bay y Estero Punta Banda ($P > 0.05$) [**Tabla 2.8**].

En referencia a la distribución de las frecuencias genotípicas de las diferentes poblaciones de *Acartia californiensis* para PGI-1

(Tabla 2.9), después de la corrección de Bonferroni ($\alpha = 0.004$), siete de ellas (SF, MR, SP, SB, SQ, GN, LP) mostraron estar fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.0001$), con excepción de YB, NB, MB, PB y OL ($P > 0.009$). Estos resultados son consecuentes con los índices de fijación F_{IS} que se muestran en las tablas 2.10-12. El índice F_{ST} promedio fue de 0.087 (Tabla 2.11).

En la figura 2.2 se presenta el comportamiento geográfico de las frecuencias alélicas C, D, E y F, y la figura 2.3 el comportamiento latitudinal de la frecuencia de los genotipos DD, DE, DF, EE, EF y FF del locus polimórfico PGI-1 de las poblaciones del copépodo calanoide marino *Acartia californiensis* en la costa nororiental del Pacífico.

El análisis de correlación canónica ($Rc = 0.95$; $\chi^2 = 18.203$, $gl = 15$) entre las tres variables físicas tomadas *in situ* ($T^{\circ}C$, $S^{\circ}/_{\infty}$ y O_2 $ml\ l^{-1}$; tabla 2.13) y las frecuencias alélicas (85, 100, 114, 128 y 143) para el único locus polimórfico observado entre las localidades muestreadas, PGI-1, resultó no significativo ($P = 0.2522$). Para el caso de la temperatura y salinidad, el análisis de correlación canónica ($Rc = 0.94$; $\chi^2 = 15.503$, $gl = 10$) resulta no significativo ($P = 0.1148$). Al considerar sólo la salinidad, el análisis ($Rc = 0.88$; $\chi^2 = 11.247$, $gl = 5$) resultó ser significativo ($P = 0.046$); para este caso las funciones canónicas son:

$$U = -1(S^{\circ}/_{\infty}) ; V = -0.425(85) + 0.284(100) + 0.000(114) - 0.213(128) + 0.992(143).$$

La **figura 2.4** muestra el comportamiento de las localidades respecto al par de funciones canónicas (U , V).

Para la relación entre la distancia genética modificada de Rogers (Wright, 1978) y la distancia geográfica (km) entre las localidades estudiadas, la prueba de Mantel (con 1000 permutaciones) para determinar la independencia entre las matrices de distancia resultó no significativo ($r = 0.021$; $P = 0.461$)

El dendrograma del locus polimórfico PGI-1 de las doce poblaciones estudiadas de la distancia modificada de Rogers (Wright, 1978) por el método UPGMA (**Figura 2.5**), mostró una correlación cofenética de 0.91.

II.4. Discusión

Desde el punto de vista de la genética de poblaciones, se han caracterizado por medio del alozimático seis especies de copépodos harpacticoides: *Tisbe biminiensis*, *T. clodiensis*, *T. holothuriae*, *Tigriopus brevicornis* y *T. fulvus* (Battaglia *et al.*, 1978) y *T. californicus* (Burton y Feldman, 1981; Burton *et al.*, 1979); y algunas especies de copépodos calanoides: *Labidocera aestiva* (Bucklin y Marcus, 1985), *Metridia pacifica* (Bucklin *et al.*, 1989) y *Calanus finmarchicus* (Kann y Wishner, 1996). Del género *Acartia*, McKinnon *et al.* (1992) investigando grupos de formas de *A. clausi*, describen como una nueva especie a *A. fancetti*; Caudill (1995) estudia la diferenciación genética de poblaciones y de especies

hermanas de *A. tonsa*, y Cervelli *et al.* (1995) analizan la diferenciación genética de especies del género *Acartia*.

De las especies anteriores, *T. californicus* fue la que presentó el valor de polimorfismo más alto, $P_{0.95} = 0.83$, con seis loci analizados (Burton y Feldman, 1981; Burton *et al.*, 1979). El resto de las especies varió entre 0.10 y 0.50, con un promedio de 16.6 loci estudiados. Fueron excepciones los altos valores de polimorfismo observado por *L. aestiva* con 0.78 ± 0.10 , donde también se analizaron con un promedio de 6 loci; sin embargo, según Bucklin y Marcus (1985) indican que estos valores tan altos posiblemente se debieron a errores de muestreo. Otra especie que se analizó fue *M. pacifica* con 0.77, donde se analizaron aproximadamente 8 loci (Bucklin *et al.*, 1989). Respecto a los valores de heterocigosis, *T. holothuriae* registró el valor más alto con $H = 0.241 \pm 0.058$, y *T. fulvus* el más bajo, $H = 0.054 \pm 0.036$; el resto fluctuó de 0.071 ± 0.032 a 0.240 ± 0.061 .

En el presente trabajo, entre los dos estudios (dos poblaciones cercanas y el extensivo a más poblaciones, incluyendo las anteriores, existió un lapso de tiempo de unos cuatro años (1994 y 1998). De acuerdo a los resultados obtenidos, en ambos estudios fue consistente el polimorfismo revelado sólo para el locus diagnóstico PGI-1, pero se observan diferencias tanto en las frecuencias alélicas como genotípicas.

En el estudio entre las poblaciones del Estero Punta Banda, B. C. (PB) y Mission Bay, California (MB), se observa una mayor diversidad alélica (10 alelos), siendo el más común el alelo C; los alelos B y D fueron característicos de PB y MB, respectivamente. El resto de los alelos resultaron con frecuencias menores a 0.04. El polimorfismo $P_{0.95}$ promedio fue de 0.125 y la desviación promedio del equilibrio de Hardy-Weinberg para las dos poblaciones no fue significativo. En el caso de las frecuencias genotípicas, los particulares para MB fueron CC y CD, y para PB resultaron CC y BC.

Para el estudio extensivo se presentaron seis alelos, donde el más común resultó ser el alelo E. Los alelos C, D y F también estuvieron presentes en las doce poblaciones, pero con cierto grado de variabilidad en sus frecuencias, siendo el menos variable el alelo C. Aquí, el polimorfismo $P_{0.95}$ promedio fue de 0.25 y la desviación promedio del equilibrio de Hardy-Weinberg para las doce poblaciones resultó significativo; en su caso, para Yaquina Bay (YB) y PB no fueron significativas.

A la luz de los resultados, los datos alozimáticos no muestran una significativa diferenciación entre algunas de las poblaciones situadas en regiones zoogeográficamente extremas, tal como son el agrupamiento de Yaquina Bay, Laguna Ojo de Liebre y Ensenada de La Paz, y otro dado por Sunset Beach Marina y San Quintín (Fig. 2.5), lo que pudiera indicar un flujo genético itrapoblacional que sobrepasa la compleja dinámica que impone el océano Pacífico en

su costa nororiental (Sistema de la Corriente de California y efecto de surgencias) sin ninguna restricción. De acuerdo a Avise (1994) la diversificación de la selección natural que opera en loci particulares vía la diferenciación en alguna característica pudiera dar una falsa impresión de un bajo flujo genético entre las poblaciones. Sin embargo, esto pudiera ser explicado por el balance de la selección al locus PGI-1, aparentemente a la salinidad (**Fig. 2.4**), más que debido al efecto homogenizador del flujo genético (**Figs. 2.2-2.3; Tablas 2.10-12**). Al investigar estadísticamente el grado de correlación de las frecuencias alélicas de PGI-1 para las poblaciones estudiadas respecto a la latitud (**Fig. 2.2**), no se muestra ninguna clina significativa; la que más se aproxima es para el alelo D ($r = 0.38$; $r_{0.10(1), 10} = 0.398$; $P > 0.10$). Para el caso de las frecuencias genotípicas (**Fig. 2.2**) la única clina que resultó significativa fue para DD ($r = 0.44$; $P < 0.10$). Así, las frecuencias de los alelos de marcadores no neutrales probablemente nos dicen más sobre las condiciones ambientales que del régimen de flujo genético de las especies (Boyer, 1974; Koehn, 1978).

Sin ser concluyentes, al parecer tales poblaciones experimentan similares respuestas por parte de las condiciones que ejerce el medio ambiente sobre los organismos, pudiéndose ver reflejados en las respuestas bioquímicas y fisiológicas, promoviendo así la selección para el mantenimiento de este locus alozimático. Similar inferencia, y de manera muy particular se ha reportado para

el copépodo harpacticoide *Tigriopus californicus* (Burton y Lee, 1994).

II.5. Referencias

- Awise, J. C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Ayala, F. J. y Kiger, J. A. (1984). *Genética Moderna*. Fondo Educativo Interamericano. México, D.F.
- Battaglia, B. y Beardmore, J. A. (1978). *Marine Organisms; Genetics, Ecology and Evolution*. Plenum Press, New York.
- Battaglia, B., Bisol, P. M. y Fava, G. (1978). Genetic variability in relation to the environment in some marine invertebrates. En: B. Battaglia y J. A. Beardmore (eds.), *Marine Organisms: Genetics, Ecology and Evolution*. Plenum Press, New York, pp. 53-70.
- Belkhir, K. (2001). GENETIX v. 4.02, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Boyer, J. F. (1974). Clinal and size-dependent variation at the LAP locus in *Mytilus edulis*. *Biol. Bull.*, 147:535-549.
- Bucklin, A. y Marcus, N. H. (1985). Genetic differentiation of populations of the planktonic copepod *Labidocera aestiva*. *Mar. Biol.*, 84:219-224.
- Bucklin, A., Rienecker, M. M. y Mooers, C. N. K. (1989). Genetic tracers of zooplankton transport in coastal filaments off Northern California. *J. Geophys. Res.*, 94:8277-8288.
- Bulnheim, H. P. y Scholl, A. (1981). Genetic variation between geographic populations of the amphipods *Gammarus zaddachi* and *G. salinus*. *Mar. Biol.*, 64: 105-115.

- Burton, R. S. (1983). Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. *Mar. Biol. Lett.*, 4: 193-206.
- Burton, R. S. (1986). Evolutionary consequences of restricted gene flow among natural populations of the copepod, *Tigriopus californicus*. Proceedings of the invertebrate larval biology workshop held at Friday Harbor Marine Laboratories, University of Washington, 26-30 march, 1995. *Bull. Mar. Sci.*, 39 (2): 526-535.
- Burton, R. S. y Feldman, M. W. (1981). Population genetics of *Tigriopus californicus*. II. Differentiation among neighbouring populations. *Evolution*, 35: 1192-1205.
- Burton, R. S., Feldman, M. W. y Curtsinger, J. W. (1979). Population structure of *Tigriopus californicus* (Copepods:Harpacticoida). I. Population structure along the central California coast. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1:29:39.
- Caudill, C. C. (1995). Molecular evidence of population genetic differentiation and sibling species in *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida). Master's thesis, Department of Zoology, University of New Hampshire, Durham, NH.
- Cervelli, M., Battaglia, B. y Bisol, P. M. (1995). Genetic differentiation in the genus *Acartia* from the Lagoon of Venice. *Vie et Milieu*, 45:117-122.
- Dawson, J. K. (1980). Recognition and occurrence of *Acartia californiensis* and *Acartia tonsa* in the Los Angeles-Long Beach Harbors and Marina del Rey, California. 2nd. Winter Meeting, ASLO, USC, Los Angeles, CA, Jan. 31-Feb. 4, 7 pp.
- Gooch, J. L. (1975). Mechanisms of evolution and populations genetics. En: O. Kinne (ed.), *Marine Ecology*, Wiley, London. Vol. II, Part. 1, pp. 349-409.

- Goudet, J. (1999). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.8). Updated from Goudet (1995; J. Hered. 86: 485-486)
- Harris, H. y Hopkinson, D. A. (1977). Handbook of Enzyme Electrophoresis. North-Holland, New York.
- Kann, L. M. y Wishner, K. (1996). Genetic population structure of the copepod *Calanus finmarchicus* in the Gulf of Maine: allozyme and amplified mitochondrial DNA variation. Mar. Biol., 125:65-75.
- Koehn, R. K. (1978). Physiology and biochemistry of enzyme variation: the inference of ecology and population genetics. En: P. Brussad (ed.), Ecological Genetics: The Inference, Springer-Verlag, New York, pp. 51-72.
- Levene, H. (1949). On a matching problem arising in genetics. Ann. Math. Statist., 20: 91 - 94.
- Levinton, J. S. (1980). Genetic divergence in estuaries. En: V. S. Kennedy (ed.), Estuarine Perspectives. Academic Press, New York, pp. 509-520.
- Levinton, J. S. (1982). Marine Ecology. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- McKinnon, A. D., Kimmerer, W. J. y Benzie, J. A. H. (1992). Sympatric sibling species within the genus *Acartia* (Copepoda: Calanoida): a case study from Westernport and Port Phillip Bays, Australia. J. Crust. Biol., 12:239-259.
- Mitton, J. B. (1997). Selection in Natural Populations. Oxford University Press.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590.
- Nevo, E. (1978). Genetic variation in natural populations: Patterns and Theory. Theor. Pop. Biol., 13: 121-177.

- Powell, J. R. (1975). Protein variation in natural populations of animals. *Evol. Biol.*, 8: 79-119.
- Raymont, M. y Rousset, F. (1995). GENEPOP (ver. 1.2): a population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. (1981). *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research- 2nd Ed.*, W. H. Freedman & Co., San Francisco.
- Swofford, D. L. y Selander, R. M. (1989). BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.*, 72: 281-283.
- Trinast, E. M. (1976). Preliminary note on *Acartia californiensis*, a new calanoid copepod from Newport Bay, California. *Crustaceana*, 31: 54-58.
- Trujillo-Ortiz, A. (1986). Life cycle of the marine calanoid copepod *Acartia californiensis* Trinast reared under laboratory conditions. *CalCOFI Rep.*, 27: 188-204.

II.6. Figuras y Tablas

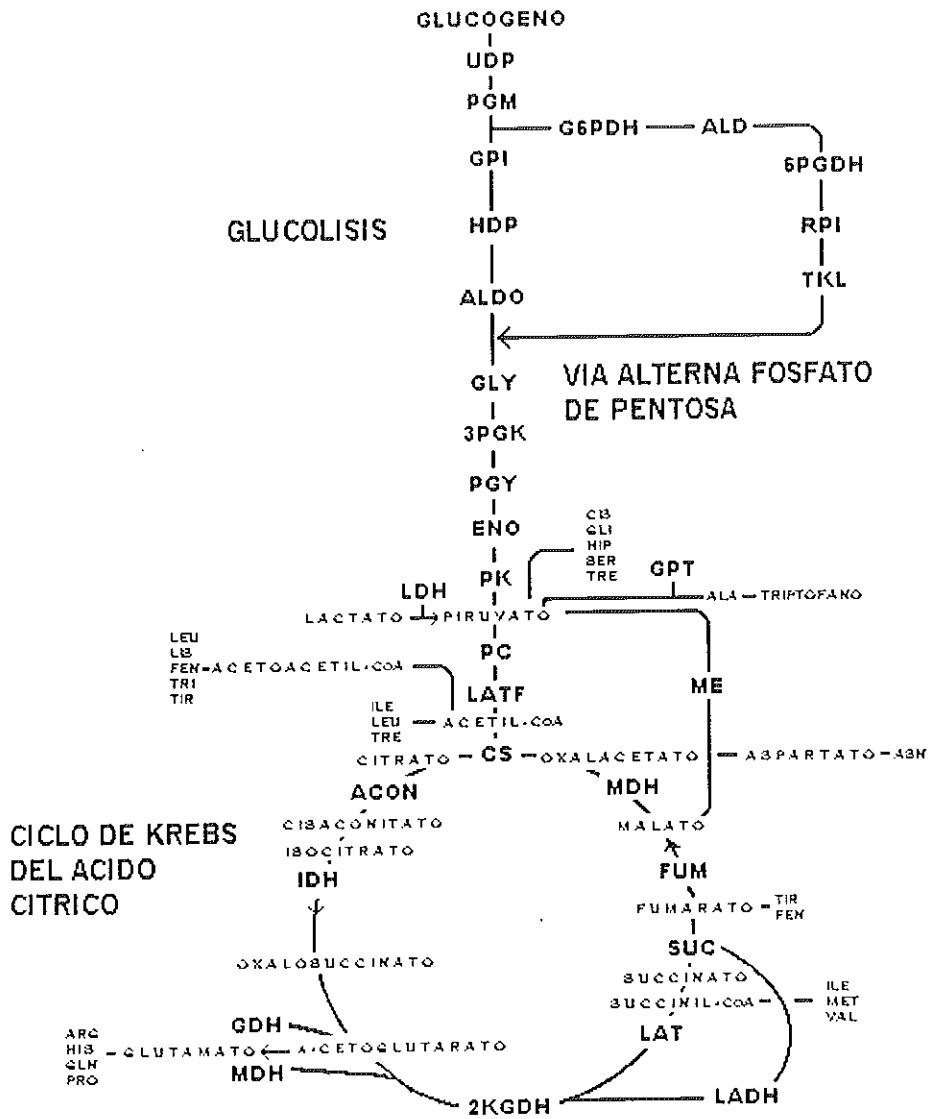


Figura 2.1. Enzimas necesarias para metabolizar una molécula de glucógeno hasta CO_2 y H_2O en las rutas metabólicas de la respiración usadas en estudios electroforéticos e interacción con la síntesis de aminoácidos.

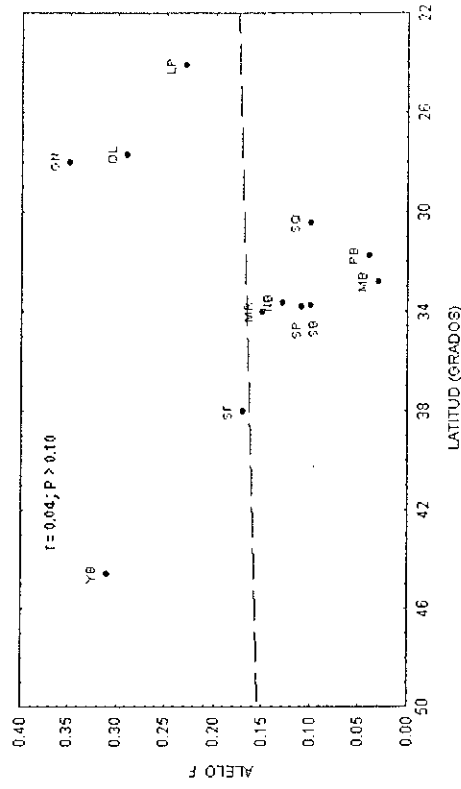
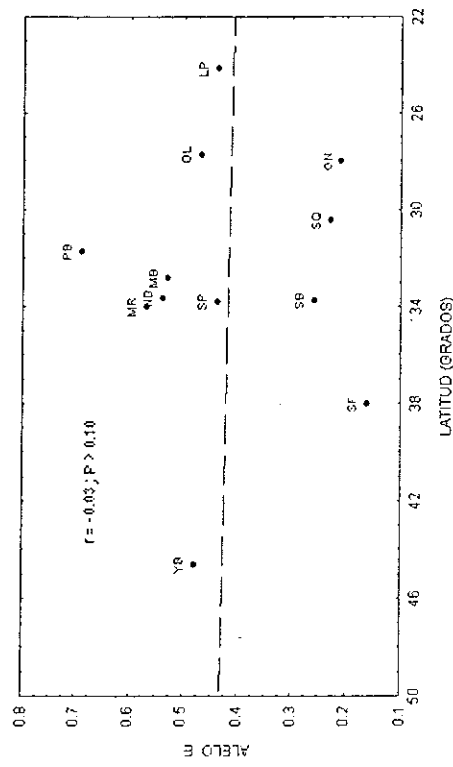
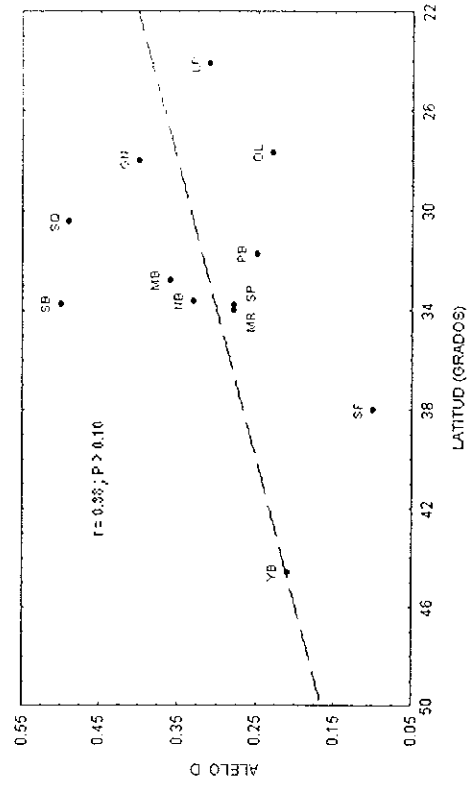
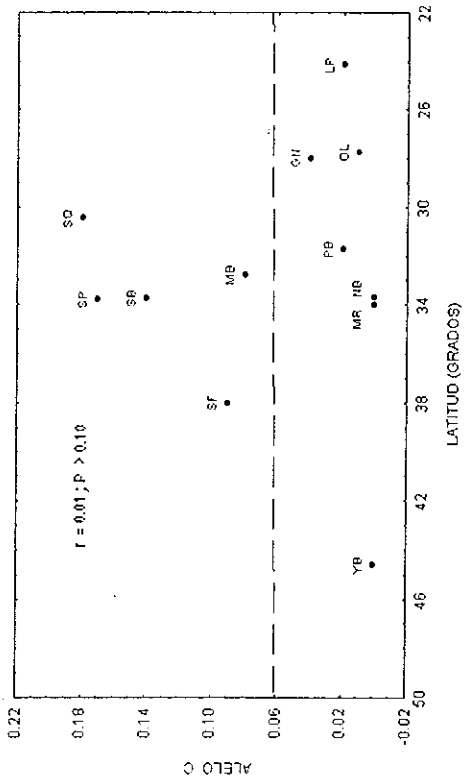


Figura 2.2. Comportamiento geográfico de la frecuencia de los alelos C, D, E y F del locus polimórfico PGI-1 de las poblaciones del copépodo calanóide marino *Acartia californiensis* en la costa nororiental del Pacífico.

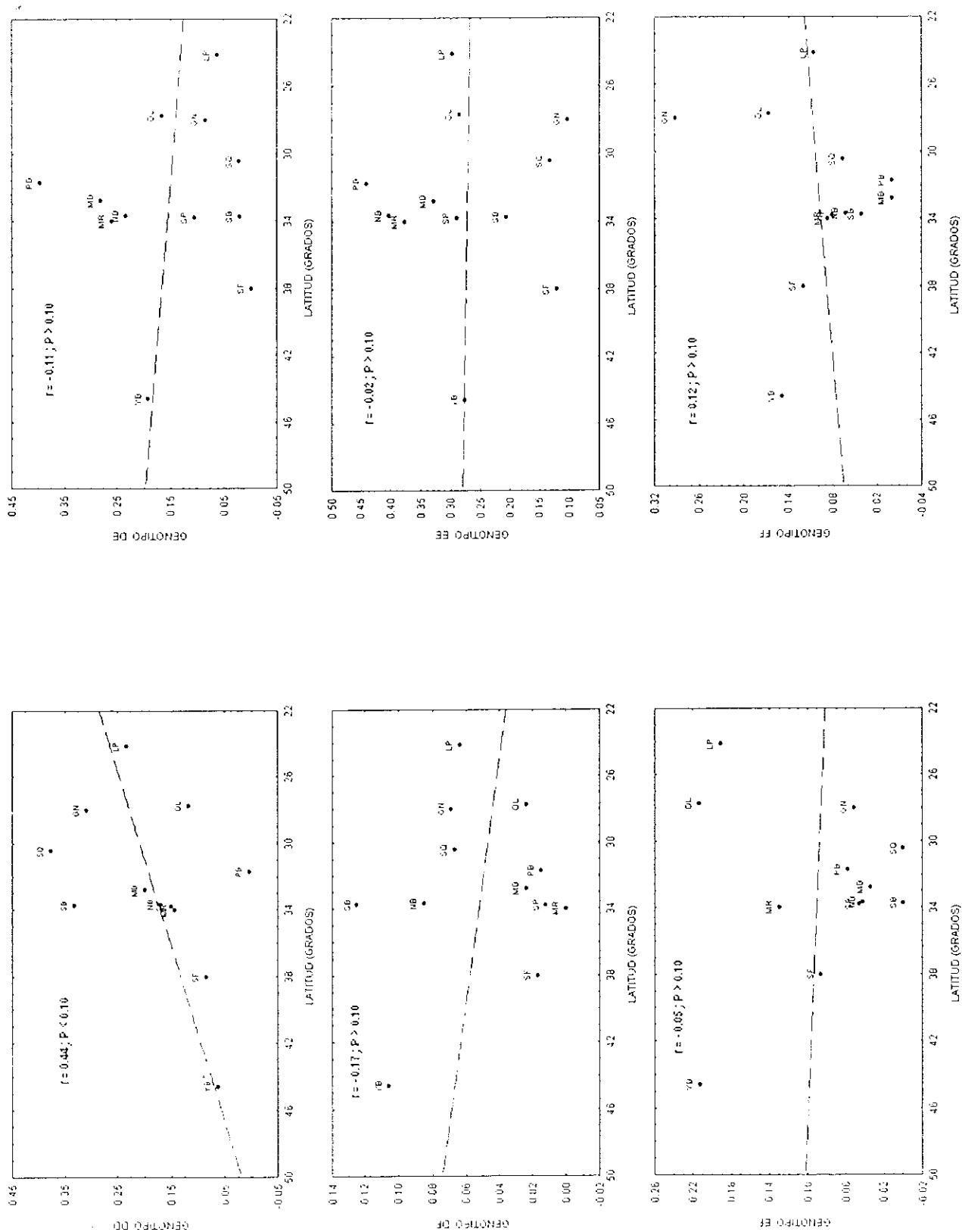


Figura 2.3. Comportamiento geográfico de la frecuencia de los genotipos DD, DE, DF, EE, EF y FF del locus polimórfico PGI-1 de las poblaciones del copepodo calanóide marino *Acartia californiensis* en la costa nororiental del Pacífico.

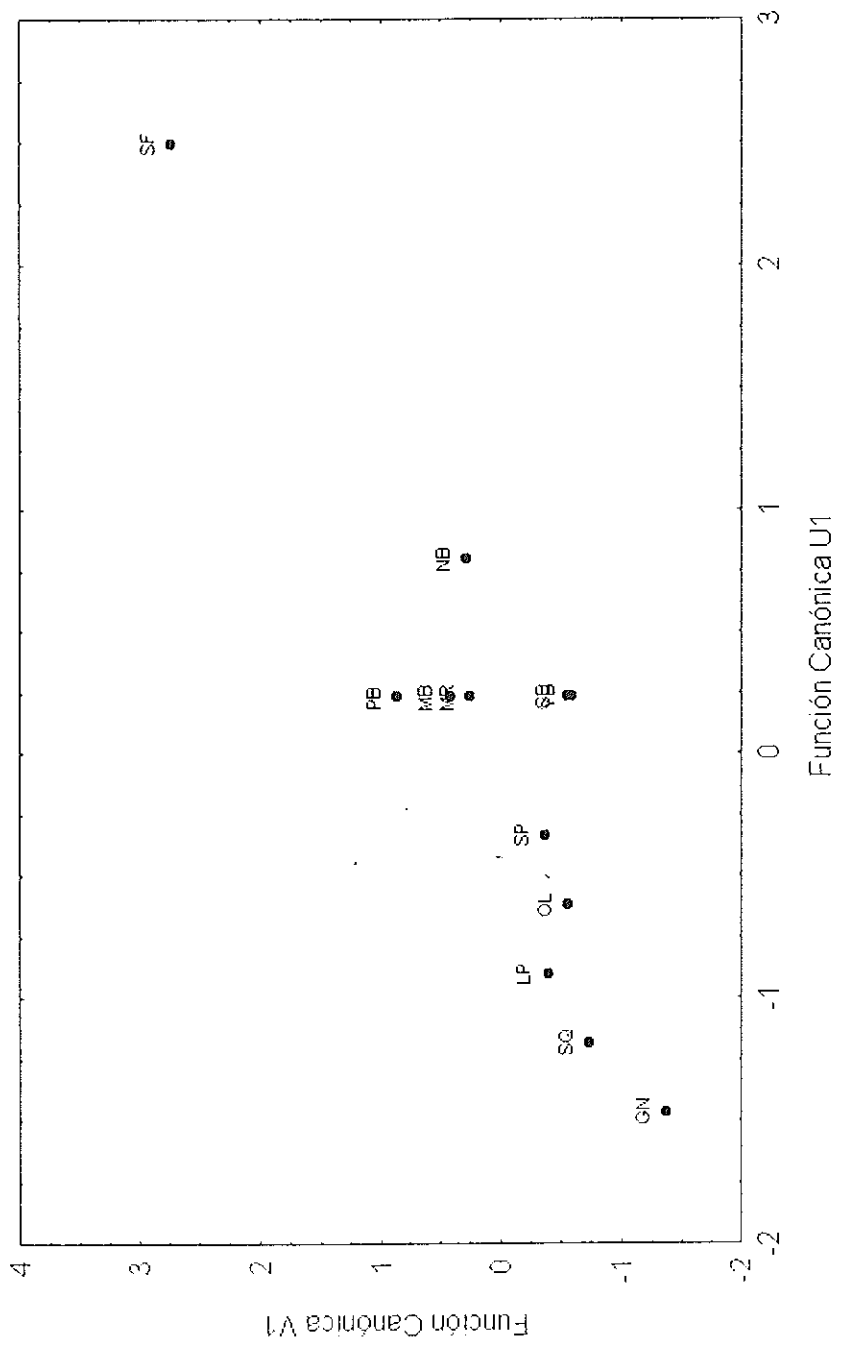


Figura 2.4. Comportamiento de las poblaciones de *Acartia californiensis* respecto al par de funciones canónicas (U, V) generadas del análisis de correlación canónica entre las frecuencias alélicas y la salinidad *in situ*.

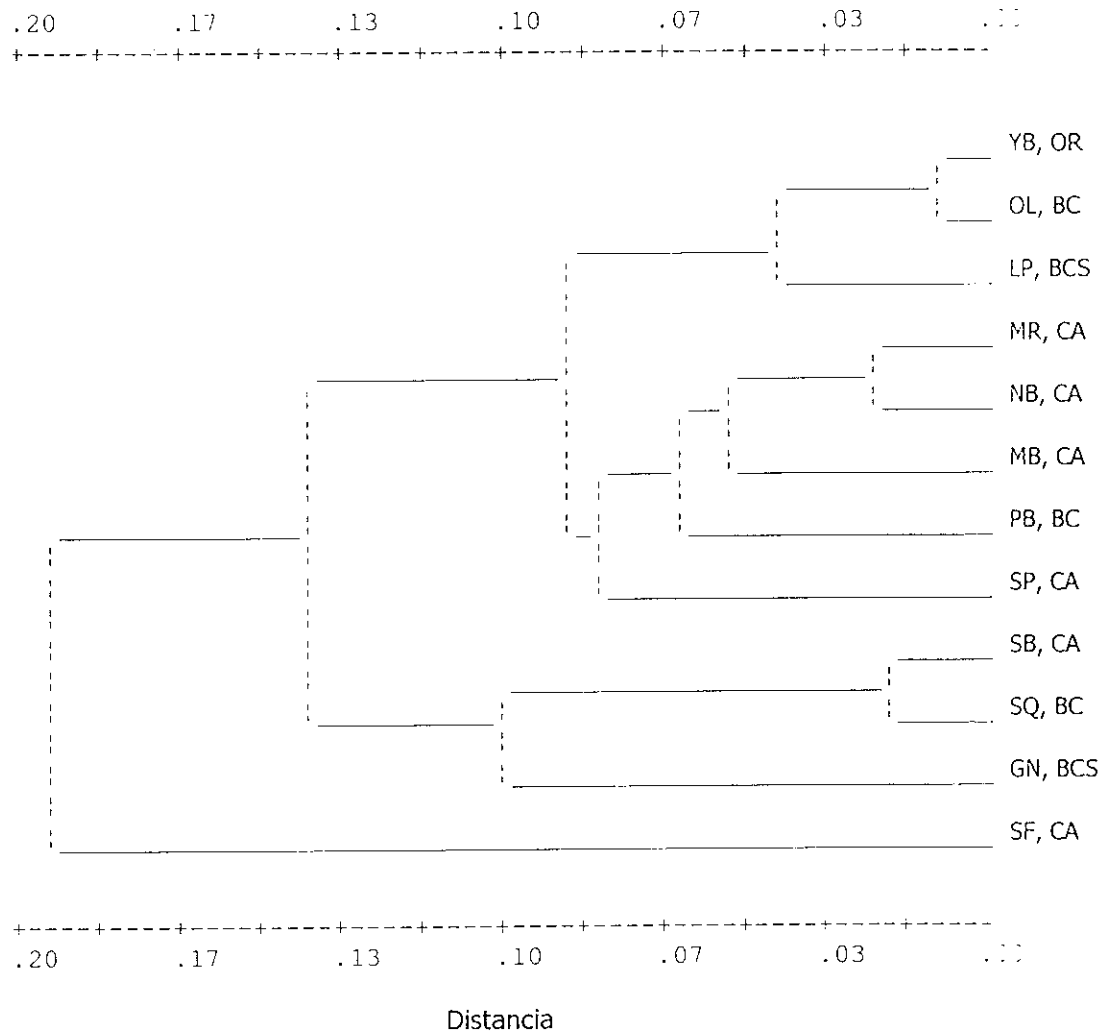


Figura 2.5. Dendrograma del locus PGI-1 de doce poblaciones del copépodo calanoide *Acartia californiensis* de la costa nororiental del Pacífico de la distancia modificada de Rogers (Wright, 1978) por el método UPGMA. La correlación cofenética es de 0.91.

Tabla 2.1. Frecuencias alélicas de los ocho loci para las poblaciones de *Acartia californiensis*.

Locus	Código	Alelo	Poblaciones	
			PB(50)	MB(50)
EST-1	C	100	1.00	1.00
LAP-1	C	100	1.00	1.00
APK-1	C	100	1.00	1.00
APK-2	C	100	1.00	1.00
GOT-1	C	100	1.00	1.00
GOT-2	C	100	1.00	1.00
ME-1	C	100	1.00	1.00
PGI-1	J	43	0	0.06
	I	61	0	0.04
	H	71	0	0.04
	G	75	0.02	0
	F	82	0	0.04
	E	86	0.08	0
	D	89	0	0.16
	C	100	0.64	0.66
	B	114	0.24	0
A	142	0.02	0	

PB. Estero Punta Banda; MB. Mission Bay; (50), número de genomas ensayados; A, B, C, etc., código asignado para la opción 3 del programa BIOSYS-1.

Tabla 2.2. Variación genética de cada población de *Acartia californiensis* ensayadas por: 1) número promedio de alelos por locus; 2) polimorfismo ($P_{0.95}$); frecuencia de loci para los cuales la frecuencia del alelo más común no es mayor que 0.95. y 3) heterocigocidad (H), frecuencia de individuos heterocigotos promediada de todos los loci.

Muestra	No. de loci	No. de alelos por locus	$P_{0.95}$	Heterocigocidad promedio		χ^2
				H_o	H_e	
PB	8	1.5 ± 0.5	0.125	0.060 ± 0.060	0.066 ± 0.066	ns
MB	8	1.6 ± 0.6	0.125	0.035 ± 0.035	0.067 ± 0.067	ns
Promedio global		1.55 ± 0.05	0.125	0.048 ± 0.013	0.067 ± 0.0005	ns

H_o , heterocigocidad observada; H_e , heterocigocidad esperada; χ^2 , prueba Ji-cuadrada; ns, no significativo; PB, Estero Punta Banda; MB, Mission Bay.

Tabla 2.3. Heterocigocidad determinada de la frecuencia alélica para PGI-1 de *Acartia californiensis*.

Población	Locus	Heterocigocidad		χ^2
		H_o	H_e	
PB	PGI-1	0.480	0.531	ns
MB	PGI-1	0.280	0.536	ns

H_o , heterocigocidad observada; H_e , heterocigocidad esperada; PB, Estero Punta Banda; MB, Mission Bay; χ^2 , prueba Ji-cuadrada; ns, no significativo.

Tabla 2.4. Prueba para determinar la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus PGI-1, por agrupamiento de clases en cada población de *Acartia californiensis*.

Población	Locus	Clase	H_o	H_e	χ^2	g.l.	P	D
PB	PGI-1	Homocigotos para el alelo más común	22	20.364				
		Heterocigotos comunes	20	23.273				
		Raros	8	6.364	1.013	1	0.314	-0.096
MB	PGI-1	Heterocigotos raros y otros heterocigotos	8	6.364	1.013	1	0.314	-0.096
		Homocigotos para el alelo más común	28	21.667				
		Heterocigotos comunes	10	22.667				
		Raros	12	5.667	16.008	1	0.000	-0.477
		Heterocigotos raros y otros heterocigotos	12	5.667	16.008	1	0.000	-0.477

PB, Estero Punta Banda. MB, Mission Bay; H_o , heterocigocidad observada; H_e , heterocigocidad esperada; χ^2 , prueba Ji-cuadrada; g.l., grados de libertad; P , nivel de significancia; D , coeficiente de desviación de Selander.

Tabla 2.5. Frecuencia genotípica del equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus PGI-I, en cada una de las poblaciones muestreadas de *Acartia californiensis*.

Población	Locus	Clase	H_o	H_e
PB	PGI-I	A-A	0.000	0.000
		A-B	0.020	0.005
		A-C	0.000	0.013
		A-E	0.000	0.002
		A-G	0.000	0.000
		B-B	0.020	0.028
		B-C	0.160	0.155
		B-E	0.020	0.019
		B-G	0.000	0.005
		C-C	0.220	0.204
		C-E	0.020	0.052
		C-G	0.020	0.013
		E-E	0.020	0.003
		E-G	0.000	0.002
G-G	0.000	0.000		
MB	PGI-I	C-C	0.280	0.217
		C-D	0.000	0.107
		C-F	0.000	0.027
		C-H	0.040	0.027
		C-I	0.000	0.027
		C-J	0.060	0.040
		D-D	0.060	0.012
		D-F	0.000	0.007
		D-H	0.000	0.007
		D-I	0.040	0.007
		D-J	0.000	0.010
		F-F	0.020	0.001
		F-H	0.000	0.002
		F-I	0.000	0.002
		F-J	0.000	0.002
		H-H	0.000	0.001
		H-I	0.000	0.002
		H-J	0.000	0.002
I-I	0.000	0.001		
I-J	0.000	0.002		
J-J	0.000	0.002		

PB, Estero Punta Banda; MB, Mission Bay; H_o , heterocigocidad observada; H_e , heterocigocidad esperada.

Tabla 2.6. Frecuencias alélicas de los cuatro loci para las doce poblaciones estudiadas de *Acartia californiensis*.

Locus	Código	Alelo	Poblaciones														
			YB(47)	SF(58)	MR(69)	SP(86)	SB(48)	NB(47)	MB(85)	PB(68)	SQ(45)	GN(58)	OL(42)	LP(47)			
APK-I	A	100	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
EST-I	A	100	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
G6P-I	A	100	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
PGI-I	A	157	0	0.31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	143	0	0.17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	128	0	0.09	0	0.17	0.14	0.14	0	0.08	0.02	0.18	0.04	0.01	0.02	0.02	0.02
	D	114	0.21	0.10	0.28	0.28	0.50	0.50	0.33	0.36	0.25	0.49	0.40	0.23	0.31	0.31	0.31
	E	100	0.48	0.16	0.57	0.44	0.26	0.26	0.54	0.53	0.69	0.23	0.21	0.47	0.44	0.44	0.44
	F	85	0.31	0.17	0.15	0.11	0.10	0.10	0.13	0.03	0.04	0.10	0.35	0.29	0.23	0.23	0.23

Entre paréntesis se presenta el número de organismos ensayados (n).

Tabla 2.7. Variación genética de las poblaciones de *Acartia californiensis* ensayadas por: 1) No. promedio de alelos por locus; 2) polimorfismo $P_{0.95}$, frecuencia de loci para los cuales la frecuencia del alelo más común no es mayor que 0.95, y 3) heterocigocidad, frecuencia de individuos heterocigotos promediada de todos los loci.

Población	No. loci	No. alelos por locus	$P_{0.95}$	Heterocigocidad promedio		χ^2
				H_o	H_e	
YB	4	1.5 ± 0.5	0.25	0.128 ± 0.128	0.159 ± 0.159	ns
SF	4	2.3 ± 1.3	0.25	0.039 ± 0.039	0.202 ± 0.202	s
MR	4	1.5 ± 0.5	0.25	0.098 ± 0.098	0.144 ± 0.144	s
SP	4	1.8 ± 0.8	0.25	0.110 ± 0.110	0.173 ± 0.173	s
SB	4	1.8 ± 0.8	0.25	0.104 ± 0.104	0.165 ± 0.165	s
NB	4	1.5 ± 0.5	0.25	0.090 ± 0.090	0.147 ± 0.147	s
MB	4	1.8 ± 0.8	0.25	0.112 ± 0.112	0.147 ± 0.147	s
PB	4	1.8 ± 0.8	0.25	0.129 ± 0.129	0.115 ± 0.115	ns
SQ	4	1.8 ± 0.8	0.25	0.100 ± 0.100	0.168 ± 0.168	s
GN	4	1.8 ± 0.8	0.25	0.073 ± 0.073	0.170 ± 0.170	s
OL	4	1.8 ± 0.8	0.25	0.107 ± 0.107	0.162 ± 0.162	s
LP	4	1.8 ± 0.8	0.25	0.090 ± 0.090	0.167 ± 0.167	s
Promedio global		1.77 ± 0.77	0.25	0.098 ± 0.098	0.160 ± 0.160	s

Poblaciones referidas por las iniciales; χ^2 , prueba Ji-cuadrada; s, significativo; ns, no significativo.

Tabla 2.8. Heterocigocidad determinada de la frecuencia alélica para el polimorfismo PGI-1 de las poblaciones de *Acartia californiensis*.

Población	Locus	Heterocigocidad		Deficiencia ó Exceso		χ^2
				<i>F</i>	<i>D</i>	
YB	PGI-1	0.511(24)	0.637(29.946)	0.190	-0.199	ns
SF	PGI-1	0.155 (9)	0.809(46.930)	0.807	-0.808	s
MR	PGI-1	0.391(27)	0.577(39.847)	0.317	-0.322	s
SP	PGI-1	0.442(38)	0.693(59.632)	0.359	-0.363	s
SB	PGI-1	0.417(20)	0.660(31.674)	0.362	-0.369	s
NB	PGI-1	0.362(17)	0.587(27.581)	0.377	-0.384	s
MB	PGI-1	0.447(38)	0.587(49.923)	0.234	-0.239	s
PB	PGI-1	0.515(35)	0.461(31.370)	-0.124	0.166	ns
SQ	PGI-1	0.400(18)	0.672(30.258)	0.398	-0.405	s
GN	PGI-1	0.293(17)	0.679(39.383)	0.565	-0.568	s
OL	PGI-1	0.429(18)	0.648(27.217)	0.331	-0.339	s
LP	PGI-1	0.362(17)	0.666(31.323)	0.451	-0.457	s

Poblaciones referidas por las iniciales: χ^2 , prueba Ji-cuadrada; s, significativo; ns, no significativo; *F*, índice de fijación de Wright (IS); *D*, coeficiente de desviación de Selander.

Tabla 2.9. Frecuencia genotípica del equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus PGI-I en las poblaciones estudiadas de *Acartia californiensis*.

Clase	YB		SF		NIR		SP		SIB		NIB		IAC		MIB		P o n e s		PB		SQ		GN		OI		IP			
	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e		
AA	0.293	0.994																												
AB	0.055	0.103																												
AC	0.000	0.054																												
AD	0.000	0.065																												
AE	0.000	0.103																												
AF	0.000	0.108																												
BB	0.138	0.026																												
BC	0.000	0.029																												
BD	0.017	0.034																												
BE	0.000	0.054																												
BF	0.000	0.057																												
CC	0.086	0.007																												
CD	0.000	0.018																												
CE	0.000	0.029																												
CF	0.000	0.030																												
DD	0.064	0.044																												
DE	0.192	0.206																												
DF	0.106	0.133																												
EE	0.277	0.227																												
EF	0.213	0.299																												
FF	0.149	0.093																												
χ^2	4.010	217.077			25.508			64.670		37.884		16.539		0.015		15.291		2.454		44.061		53.995		17.098		26.116				
g.l.	3	15			3		6	6		6		3		6		6		6		6		6		6		6				
P	0.260 ns	< 0.000 s			< 0.000 s			< 0.000 s		< 0.000 s		0.001 s		0.018 ns		0.874 ns		0.874 ns		< 0.000 s		< 0.000 s		0.009 ns		< 0.000 s				

Poblaciones referidas por las iniciales; H_o, heterocigicidad esperada; H_e, heterocigicidad observada; χ^2 , prueba Ji-cuadrada; g.l., grados de libertad [= m*(m-1)/2; m = No. de alelos]; P, nivel de significancia; ns, no significativo; s, significativo. Ref. $\alpha = 0.00427$ por corrección de Bonferroni (0.05) para las doce poblaciones.

Tabla 2.10. Valores del índice de fijación F_{IS} para el locus PGI-I relativo a las subpoblaciones de *Acartia californiensis*.

Alelo	Subpoblación											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0.919										
B		0.811										
C		1.000		0.031	-0.157		0.250	-0.023	-0.064	-0.045	-0.012	-0.022
D	0.111	0.814	0.346	0.364	0.333	0.278	0.310	-0.098	0.555	0.640	0.388	0.651
E	0.190	0.685	0.201	0.409	0.730	0.443	0.197	-0.171	0.441	0.370	0.236	0.438
F	0.252	0.637	0.495	0.704	0.330	0.427	-0.037	-0.038	0.630	0.736	0.417	0.288
Promedio	0.190	0.807	0.317	0.359	0.362	0.377	0.234	-0.124	0.398	0.565	0.331	0.451

Tabla 2.11. Índices de fijación para los alelos individuales del locus polimórfico PGI-1 de *Acartia californiensis*.

Alelo	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
A	0.919	0.943	0.292
B	0.811	0.840	0.152
C	0.108	0.171	0.071
D	0.384	0.419	0.056
E	0.328	0.398	0.103
F	0.459	0.498	0.072
Promedio	0.379	0.434	0.087

Tabla 2.12. Valores de los estadísticos F no jerárquicos para los alelos del locus PGI-1 en *Acartia californiensis*.

Alelo	Frecuencia promedio	Variancia muestral	Varianza actual	Varianza limitante	F_{DT}
A	0.02586	0.00015	0.00720	0.02519	0.286
B	0.01365	0.00010	0.00195	0.01346	0.145
C	0.06239	0.00047	0.00369	0.05849	0.063
D	0.31078	0.00184	0.01010	0.21420	0.047
E	0.41893	0.00198	0.02321	0.24343	0.095
F	0.16839	0.00124	0.00885	0.14003	0.063
Total		0.00578	0.05500	0.69481	0.079
Promedio		0.00578	0.05500	0.69481	0.079

Tabla 2.13. Datos oceanográficos *in situ* de las localidades muestreadas.

Localidad	Temperatura (°C)	Salinidad (‰)	Oxígeno (ml/l)
YB	13.0	32.0	6.3
SF	18.6	24.0	6.8
MR	25.0	32.0	6.2
SP	23.5	34.0	6.5
SB	22.0	32.0	6.4
NB	24.0	30.0	7.0
MB	25.0	32.0	6.4
PB	26.0	32.0	6.3
SQ	27.0	37.0	6.9
GN	28.0	35.0	6.2
OL	27.0	38.0	6.1
LP	31.0	36.0	5.7

CAPÍTULO III

ANÁLISIS MOLECULAR DE *Acartia californiensis* POR ADN MITOCONDRIAL

III.1. Introducción

En los últimos diez años se han desarrollado una variedad de técnicas moleculares que han permitido evaluar la variabilidad genética y secuenciar el ADN y que, de alguna manera, han apoyado ó incluso reemplazado las técnicas alozimáticas en el análisis de la estructura de poblaciones (Awise, 1992; Karl y Awise, 1992; Burton, 1994). En un sentido se ha mejorado la resolución y el nivel de estudio sin dejar de considerar que cada técnica tiene sus propias bondades y limitaciones. Una de las primeras técnicas es la secuenciación directa de porciones amplificadas de genes sin un paso intermedio de clonación (Innis *et al.*, 1988). También destacan los protocolos de secuenciación automática (Smith *et al.*, 1986; McBride *et al.*, 1989) y el uso del consenso de cebadores para la amplificación y secuenciación, obviando la necesidad de datos previos de secuenciación de las especies bajo estudio (Kocher *et al.*, 1989; Innis *et al.*, 1990).

El análisis detallado de la variación en la secuencia del ADN dentro de las especies ha revelado ó aportado conocimiento acerca de su biología, incluyendo la variabilidad reproductiva, dispersión y supervivencia, así como también entender los procesos por los cuales evolucionan los genes y las especies.

El análisis de polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del ADNmt, también ha sido aplicado en muchos organismos (Awise *et al.*, 1987). Entre los invertebrados marinos analizados, algunos han revelado acerca de la estructuración genética de las poblaciones de meso a gran escala (100's a 1000's km) como es el caso del cangrejo herradura *Limulus* (Saunders *et al.*, 1986), el ostión *Crassostrea* (Reeb y Awise, 1990), el mejilón *Mytilus* (Edwards y Skibinsky, 1987) y el copépodo *Calanus pacificus* (Bucklin y Kann, 1991). También el análisis de RFLP ha revelado la diferenciación genética significativa entre las poblaciones geográficas de peces marinos como el arenque (Kornfield y Bogdanowicz, 1987), tambor rojo (Gold y Richardson, 1991), merluza (Zwanenburg *et al.*, 1992), lenguado (Stott *et al.*, 1992) y pez espada (Grijalva-Chon *et al.*, 1994), aplicando las técnicas de alozimas y RFLP, donde el primero logra diferenciar las poblaciones y no así el segundo.

La variación de secuencia de bases del ADNmt también ha sido utilizado para examinar los patrones de variación intraespecífica de peces marinos e invertebrados (Awise *et al.*, 1987). Awise (1994) y Hillis *et al.* (1996) mencionan que el análisis secuencial del ADNmt se ha convertido en una herramienta poderosa para el estudio filogenético, además de la genética

poblacional en muchos taxa. La secuencia de bases de una porción del citocromo b ha sido empleado para discriminar poblaciones de bacalao (Carr y Marshall, 1991a, 1991b) y del márlin azul (Finnerty y Block, 1992). Los genes mitocondriales han revelado una considerable variación de la secuencia intraespecífica en el erizo *Strongylocentrotus pallidius* (Palumbi y Kessing, 1991) y *Heliocidaris tuberculata* (McMillan *et al.*, 1992), y en el camarón penéido *Penaeus stilyrostris* (Palumbi y Brand, 1993); sin embargo, en todas estas especies se ha observado muy poca ó ninguna estructura genética. Ante esto, surgen dos principios generales: (1) tanto los peces marinos como los invertebrados son muy variables a nivel proteico y molecular, y (2) la variabilidad esta presente en poblaciones geográficas genéticamente distinguibles en algunas especies (Overden, 1990).

Las características mitocondriales poseen distintas ventajas como indicadores de la estructura poblacional: el genoma es clonalmente heredado por vía materna, haciéndolo un indicador conservador de patrones de apareamiento en poblaciones naturales (Awise *et al.*, 1979; Wilson *et al.*, 1985). La forma en que se heredan las características mitocondriales tiene muchas implicaciones para la distribución de las poblaciones. Primero, cuando la transmisión paterna es despreciable, los genes mitocondriales revelarán mejor la estructura poblacional que los genes nucleares (Birky *et al.*, 1989). También, si las hembras tienen una tasa de migración efectiva más baja que los machos, las frecuencias genéticas mitocondriales serán homogeneizadas más lentamente que las nucleares (Birky *et al.*, 1989).

En los invertebrados, el ADNmt es una molécula circular cerrada [(Fig. 3.1; Crease, 1999 (como ejemplo se toma el modelo para el cladóceros *Daphnia pulex*)] de aproximadamente 15,000 a 18.000 pares de bases (pb). Cada molécula codifica para 2 genes ARN ribosomales, 22 ARN de transferencia, 13 proteínas y la replicación ó región D-Loop (control) [Tabla 3.1; Crease, 1999]. Aunque el ADNmt comprende menos del 1% del genoma total de cada célula, posee dos características importantes: (1) una alta tasa de evolución y (2) el modo materno de transmisión, donde los cambios que ocurren durante la recombinación sexual no tienen efecto. Los genes del ADNmt evolucionan de 5 a 10 veces más rápido que su contraparte nuclear, proveyendo una visión amplificada de la diferenciación poblacional (Brown *et al.*, 1979). En contraste, el ADN nuclear consiste de unos 3×10^6 pb que codifican a cerca de 7×10^4 genes. Además de que el elevado número de copias de genomas por célula (1000's) se opone a las dos copias de un gene nuclear dado.

La evolución del ADNmt está íntimamente ligada a la mutación; la tasa de cambio sinónima de una proteína que codifica a un gene es de cerca de 5.7×10^{-8} sustituciones por sitio por año, lo cual es más de 10 veces más rápida que la nuclear y la no sinónima varía entre los genes, pero también es más rápida que la nuclear (Taanman, 1999). Todo esto puede ser explicado por la baja fidelidad en la replicación del ADN, los ineficientes mecanismos de reparación de la polimerasa y la presencia de los radicales libres generados como productos del metabolismo oxidativo ó mutágenos (Joenje, 1989); lo que permite a los investigadores diferenciar poblaciones que se han

separado. Además, la selección natural no tiene afecto en los cambios que sufre el ADNmt y sólo es diferente por los cambios debidos al tiempo que ocurren a una tasa constante.

Las características moleculares pueden dar información sobre la biología poblacional de una especie. Particularmente, la distribución genética de las poblaciones geográficas y sus frecuencias genotípicas (o, para genomas haploides como ADNmt, haplotipo) pueden ser estadísticamente comparadas. Otra característica útil es la diversidad molecular de la población medida por el número de haplotipos ó diversidad haplotípica (h), ó diversidad nucleotídica (p_i ; divergencia genética entre haplotipos). Estas características moleculares se utilizan para determinar si existen poblaciones genéticamente distintas.

Actualmente, ningún método bioquímico ó inmunológico da una identificación clara y absoluta, debido a que las especies varían considerablemente en sus propiedades (Ghosh y Campbell, 1988). Los métodos que se basan en el análisis genómico son rápidos y más exactos que los basados en las propiedades fenotípicas; destacando los que utilizan sondas oligonucleótidas marcadas radiactivamente. Estas se basan en estudiar la secuenciación de las bases nucleotídicas de fragmentos de genes conservados evolutivamente en los organismos. Tal es el caso del estudio de las frecuencias genotípicas del ADNmt (haplotipos) en la secuencia del gen 16S ARNr del cual existe un número creciente de información sobre la variación inter e intraespecífica de varias especies (Xiong y Kocher, 1991;

Cunningham *et al.*, 1992; Bucklin *et al.*, 1992, 1995, 1996). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el estudio de poblaciones de copépodos (Bucklin y Kann, 1991; Kann y Wishner, 1996; Bucklin *et al.*, 1992, 1995, 1996). Igualmente, se ha utilizado la secuenciación del segmento del gen ADNmt citocromo-oxidasa c subunidad I (COI) en estudios para resolver las relaciones filogenéticas entre especies morfológicamente similares de erizos marinos (Berminham y Lessios, 1993; Palumbi, 1996) y de moluscos gastrópodos (Harasewych *et al.*, 1997). Ha sido útil también en la diferenciación entre subpoblaciones del erizo *Strongylocentrotus purpuratus* (Edmands *et al.*, 1996), en la diferenciación genética en especies chinas de cangrejos del género *Charybdis* (Chu *et al.*, 1999), en la divergencia y especiación en camarones del género *Alpheus* (Knowlton *et al.*, 1999) y en el análisis del complejo de especies del coral del caribe *Montastraea annularis* (Medina *et al.*, 1999). El gen COI también se ha usado en el estudios genéticos de poblaciones de copépodos como *Tigriopus californicus* (Burton y Lee, 1994; Burton, 1998), *Diaptomis leptosus* (Guarnieri, 1996), *Eurytemora affinis* (Lee, en prensa), *Calanus finmarchicus*, *C. glacialis*, *C. helgolandicus*, *Neocalanus cristatus*, *N. flemingeri*, *N. plumchrus*, *Pseudocalanus moultoni* y *P. newmani* (Bucklin *et al.*, 1999).

Resulta pertinente señalar que se pueden obtener secuencias de fragmentos específicos de ADN con un número relativamente pequeño de individuos de cada población a estudiar; pero el problema es el alto costo de los análisis, tanto en el trabajo técnico especializado, así como en equipo y reactivos. No obstante, la secuenciación de fragmentos y el análisis de los

datos permiten obtener un valiosísimo contenido fino de información que, dependiendo de las preguntas e hipótesis que se planteen, la secuenciación del ADN puede resultar muy efectivo. De particular interés resulta la variación del ADNmt, que ha sido utilizada para analizar los patrones geográficos de la variación intraespecífica en diferentes especies (Awise *et al.*, 1987).

En el presente trabajo de investigación, en el análisis molecular de las distintas poblaciones del copépodo calanoide marino *Acartia californiensis* se emplearon las frecuencias genotípicas del ADNmt (haplotipos) en la secuencia del fragmento mitocondrial del gen citocromo-oxidasa c subunidad I, COI, (Folmer *et al.*, 1994). Existe un número creciente de información sobre este gen, en relación a la variación inter e intraespecífica. De acuerdo a Brown (1985), el fragmento COI parece estar entre los genes codificados de proteínas más conservadores en el genoma mitocondrial de los animales. El análisis de la secuenciación del fragmento COI ha revelado la estructura genética tanto de poblaciones de invertebrados marinos así como de copéodos (Burton y Lee, 1994) y erizos marinos (Palumbi, 1996).

Se ha demostrado que la variación en la secuencia del COI es útil para resolver las relaciones evolutivas entre grupos de especies muy cercanas en una amplia variedad de taxa (Jacobs y Grimes, 1986; Awise, 1994; Brown *et al.*, 1994; Lunt *et al.*, 1996; Harasewych *et al.*, 1997). También ha sido empleado en estudios genéticos poblacionales de una amplia variedad de organismos.

El análisis del COI es útil para diferenciar especies, mientras el análisis alozimático es útil para diferenciar poblaciones y especies (Awise.

1994). Para la mayoría de las especies, la variación del COI dentro de una especie resulta ser mucho menor que la variación entre especies, haciendo de este gen una característica sistemática molecular de diagnóstico útil. Los estudios han mostrado que la variación de la secuencia del COI dentro de las poblaciones de una especie son de un 1-2%, mientras que la variación entre diferentes especies van de un 10-20% (Bucklin *et al.*, 1998a, 1999, 2000b).

Varios estudios sobre sistemática molecular y de genética poblacional en copépodos calanoides y eufáusidos, han mostrado la utilidad de los datos de las secuenciaciones del COI (Bucklin *et al.*, 1997a, 1997b, 1998a, 1999, 2000a, 2000b). Entre las especies de copépodos calanoides estudiados están las familias Calanidae [incluyendo, de acuerdo a Bradford (1988), 29 especies pertenecientes a ocho géneros] y Clausocalanidae [que incluyen, de acuerdo a Frost y Fleminger (1968), al menos 28 especies pertenecientes a seis géneros].

Bucklin *et al.* (1999) determinaron la secuenciación de 19 especies pertenecientes a seis géneros de copépodos calanoides de una región del COI de ~650 pb. Las diferencias en las secuencias entre las especies variaron de 8-21%; estos autores determinaron las relaciones evolutivas entre especies congénicas. También permitió discriminar las poblaciones geográficas de *Calanus helgolandicus* (del Mar Adriático, Mar del Norte y extensión de la Corriente del Golfo) y *C. pacificus* (de la Corriente de California y del Giro Central del Pacífico Norte).

Es importante destacar que la región seleccionada del gen COI es lo suficientemente variable para encontrar relaciones entre los géneros,

mostrando ser la "columna vertebral" filogenética en relación a la secuencia nuclear corta más conservadora, la subunidad 16S ARNr (región de ~350 pb), que difiere en menos del 1% entre las especies (Bucklin *et al.*, 1999).

En análisis sobre la variabilidad del COI entre especies de eufáusidos, pertenecientes a los géneros *Stylocheiron* y *Nematoscelis*, ha mostrado que la región de ~650 pb del COI claramente discrimina y revela las relaciones evolutivas entre ocho especies (Bucklin *et al.*, 2000b); mientras la región de ~350 pb del 16S ARNr nuclear revela relaciones entre los géneros. Por otro lado, se ha encontrado que las diferencias en las secuencias de ADN para COI entre catorce especies pertenecientes a ocho géneros, varían de 11-25% para COI, mientras que para la región nuclear 16S ARNr difiere únicamente en un 1%.

Todos estos estudios han demostrado que, en base a la variación de las secuencias del gen COI, resulta fácil distinguir entre especies de copépodos calanoides y de eufáusidos. Además, mostró ser una herramienta de diagnóstico molecular de rápido diseño (Bucklin *et al.*, 1997a, 1998a, 2000a).

Existe una creciente lista de especies de copépodos a los que se ha secuenciado el gen COI. De acuerdo al banco de datos de nucleótidos por Internet, GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), de los diez órdenes de copépodos se han analizado el siguiente número de especies: Calanoidea, 49; Harpacticoida, 5, y Cyclopoida, 1 (**Tabla 3.2**). Para el género *Acartia*, únicamente existe la secuenciación de 443 pb de *Acartia tonsa* (AF259662). A partir de lo anterior, en este aspecto reside la

importancia del presente estudio y a la contribución al conocimiento sobre la biología de *A. californiensis*.

III.2. Materiales y Métodos

III.2.1. Preservación

Se utilizó el mismo procedimiento de preservación que para el análisis alozimático. Los fundamentos de los protocolos del análisis se basaron en Palumbi *et al.* (1991) y Burton y Lee (1994).

III.2.2. Extracción del ADN genómico total

El ADN total para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988), se obtuvo colocando en forma individual los organismos adultos intactos de cualquier sexo de *Acartia californiensis*, los cuales fueron seleccionados a partir de muestras congeladas a -80°C en tubos Eppendorf de 1.5 ml con 20 µl de amortiguador para lisar con proteinasa K (ProK) (Hoelzel y Green, 1992). La proteinasa K es una serina proteasa la cual sirvió para digerir las proteínas nativas y para cortar/separar los restos carboxílicos de aminoácidos aromáticos, hidrofóbicos y alifáticos. Los tubos se incubaron en baño María a 65°C por 1 h y posteriormente a 95°C por 15 min para inactivar la ProK. La incubación ayudó a la ruptura celular y de la membrana de los organelos. Las muestras se usaron inmediatamente ó se mantuvieron a -20°C hasta su uso posterior. De cada población se tomaron de 3 a 5 individuos.

III.2.3. Amplificación del ADN por PCR

Los cebadores universales que se utilizaron para la amplificación del fragmento del gen del ADNmt citocromo-oxidasa c subunidad I fueron:

LCO 1490 (sentido (directa)), 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')

[Primer No. A6708D03; GIBCO BRL, Life-Technologies]

y

HCO 2198 (antisentido (inversa)), 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')

[Primer No. A6708D04; GIBCO BRL, Life-Technologies].

Los números se refieren a la posición del nucleótido 5' de cada iniciador para los filamentos ligero (L) y pesado (H) respecto a la secuencia dada por Folmer *et al.* (1994) y además están basados en la secuencia de *Drosophila yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985). Los cebadores amplificaron aproximadamente 710 pb del fragmento COI.

De un volumen final de 25 μ l de cada muestra incubada se tomó 1 μ l de extracto de ADN el cual se colocó en tubos de 0.5 μ l para PCR al cual se le añadieron 19.5 μ l de agua esterilizada y bidestilada (ddH₂O) y 5 μ l de la mezcla de reacción para PCR.

La mezcla de reacción para PCR se preparó con 2.5 μ l 10X del amortiguador de reacción para PCR (el cual contiene MgCl₂ 15 mM), 0.5 μ l de dNTP's 10 mM (mezcla de desoxinucleótidos de trifosfatos libres), 0.5 μ l del iniciador 1 (LCO) 10 μ M, 0.5 μ l del iniciador 2 (HCO) 10 μ M y 0.5 μ l de *Taq* polimerasa.

En todas las amplificaciones se utilizó una de las muestras la cual sirvió como control negativo; a ésta se le añadieron todos los componentes, excepto el extracto de ADN. De ser necesario y dependiendo del termociclador utilizado, ya sea con bloque de calentamiento superior ó no, a cada mezcla se le podían añadir dos gotas de aceite mineral para evitar la evaporación. Se mezcló por vórtex y se centrifugaron rápidamente a 6,000 rpm por 30 seg. Las reacciones se amplificaron en un termociclador programable usando 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 40°C por 45 seg y 72°C por 1 min; el paso inicial de desnaturalización a 94°C duró 3 min y la extensión final a 72°C fue de 4 min. Los productos amplificados que se secuenciaron se verificaron por cantidad (tamaño) y calidad cargando 5 μ l de la muestra amplificada en gel de agarosa/TBE de baja fusión al 1.5% p/v [3 g agarosa en 200 ml 0.5X amortiguador tris borato EDTA (TBE)] y se ensayó una electroforesis estándar por sumersión del gel por 30 min a 75 V y se tiñió con una solución de bromuro de etidio (BrEt) al 1% por aproximadamente 30 min. La visualización se hizo en un transiluminador bajo luz UV. En la primera línea de cada gel se colocó como control positivo (estándar de tamaño molecular) el marcador ϕ X174/*Hae*III (fago/digerido por). Se tomó una impresión fotográfica Polaroid para su registro en la bitácora (Fig. 3.2). Las muestras amplificadas se usaron inmediatamente ó se conservaron a -20°C hasta su uso posterior.

III.2.4. Limpieza del producto de PCR

Las muestras amplificadas que presentaron bandas claras de ADN se limpiaron removiendo los cebadores (>99.5%) para la secuenciación; para llevar a cabo lo anterior, se tomaron 20 μ l del fragmento del ADNmt amplificado y se siguió el protocolo de extracción del paquete de purificación QIAquick (Qiagen).

Una vez purificado el ADNmt, se preparó para su secuenciación en un sentido (inverso), para lo cual se colocaron en tubos de 200 μ l (para obtener una mezcla final de 20 μ l) 8 μ l ddH₂O, 1 μ l del iniciador 2 (HCO) 3 μ M, 5 μ l del fragmento de ADNmt purificado, 4 μ l de la mezcla de reacción ya preparada (RR) del finalizador BigDye y 2 μ l 5X de amortiguador para BigDye; una vez hecha la mezcla se centrifugó a 6,000 rpm por 30 seg. La muestra se colocó en un termociclador controlado con el siguiente perfil de programa: 95°C por 100 seg; 50°C por 10 seg y 60°C por 4 min durante 25 ciclos; el paso inicial de desnaturalización a 95°C duró 3 min y la extensión final a 60°C fue de 4 min.

III.2.5. Purificación del producto a secuenciar

Para la eliminación de los cebadores y dNTP's no incorporados (mezcla de reacción fluorescentes: exceso de colorantes finalizadores BigDye), cada producto para secuenciar se limpió de acuerdo al protocolo para la columna de limpieza para centrífuga CentriSep utilizando 0.06 g de Sephadex G-50 y 1.5 ml ddH₂O. Una vez limpio el producto, la muestra se

secó por centrifugación al vacío utilizando el CentriVap concentrator cold trap LABONCO.

III.2.6. Secuenciación del ADN en un sentido (HCO:3'-5')

Los productos del PCR purificados fueron secuenciados utilizando el secuenciador automático Applied Biosystems 373 DNA Sequencer (ABI 373A), los cuales se ensayaron y analizaron en placas de gel de acrilamida al 5% (48 x 37.3 cm) utilizando la solución gel 'stock' Long Ranger. Cada secuencia se corrió por electroforesis durante 20 h a 30 W. La secuenciación produjo un espectro de emisión fluorescente para cada base, para lo cual se obtuvo un cromatograma de cuatro colores. Los resultados de las secuencias por copépodo-población se editaron y se incluyeron a una base de datos en computadora.

III.2.7. Análisis de los datos

Para el cálculo de la diversidad nucleotídica (Π y π) intra e interpoblacional y del número promedio de nucleótidos diferentes (π_{ij}), se generó el programa FRECNucle en MATLAB, de acuerdo a los estimadores:

$$\Pi = \frac{\sum \pi_{ij}}{n_c}$$

donde π_{ij} es la proporción de nucleótidos diferentes entre los haplotipos i e j , y n_c es el número total de pares de comparaciones de secuencias [$n(n-1)/2$]

(Nei, 1987). La diversidad nucleotídica estandarizada por el tamaño de la secuencia,

$$\pi = \frac{\Pi}{L}$$

donde L es el tamaño de la secuencia (longitud).

Para los alineamientos de las secuenciaciones (homologías), la generación de dendrogramas discretos de máxima parsimonia, la estimación de los porcentajes de similitud entre y dentro las poblaciones, la búsqueda de agrupamientos robustos (significancia estadística) por la técnica de remuestreo Bootstrap y la determinación de las significancias, se utilizó el paquete de computación PAUP 4.0 (Swofford, 1998; y distribuido por Illinois Natural History Survey, Champaign).

En la generación de los dendrogramas de las secuencias por distancia Euclidiana, se usó el análisis de conglomerados por el método del vecino más cercano (CLINK), adecuando el paquete estadístico STATISTICS.

Para la determinación de la estructura genética poblacional se utilizó el análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) del paquete ARLEQUIN 2000 (Schneider *et al.*, 2000). El AMOVA realiza un análisis anidado de dos vías, locus por locus, haciendo la partición de la varianza total observada (σ^2) en los componentes de la varianza debidos a las diferencias intergrupales (σ_a^2), a las diferencias poblacionales dentro de los grupos (σ_b^2) y a las diferencias intrapoblacionales (σ_c^2), por medio de los cuales se estimaron los estadísticos *F* de Wright (índices de fijación) de

acuerdo a Weir y Cockerham (1984) y Michalakis y Excoffier (1996). Para evaluar la significancia del estadístico F_{ST} , se usó la prueba χ^2 de Workman y Niswander (1970) modificada,

$$\chi^2 = kF_{ST}$$

con $(s-1)(n-1)$ grados de libertad; donde k es el número de loci polimórficos revelados, n es el número de individuos analizados y s el número de localidades (poblaciones). Para el cálculo exacto de los niveles de significancia, se usó la calculadora de probabilidades del paquete STATISTICS.

Utilizando el estadístico F_{ST} , se estimó el flujo genético (dispersión= $N_e m$) de acuerdo a la propuesta de Wright (1951),

$$N_e m = 0.25(F_{ST}^{-1} - 1)$$

donde N_e es el número estimado de individuos en una población dada y m es la proporción de individuos reproductivos que migran.

La distancia genética promedio se estimó utilizando el coeficiente de co-ancestro modificado de Weir y Cockerham (1984)

$$D = -\ln(1 - F_{ST}),$$

donde D se incrementa de manera aproximadamente lineal con el tiempo.

III.3. Resultados

Por medio del análisis molecular se logró secuenciar una región de 660 pb del gen ADNmt COI de 28 individuos pertenecientes a ocho

poblaciones del copépodo calanoide marino *Acartia californienesis*, distribuidas a lo largo de la costa nororiental del Pacífico con la cantidad y calidad adecuada de ADN. Las poblaciones y el número de individuos de cada una fueron los siguientes: Yaquina Bay (3); San Francisco Bay (4); Sunset Beach (3); Marina del Rey (6); Mission Bay (4); Estero Punta Banda (3); Laguna de Guerrero Negro (3), y Ensenada de La Paz (2).

El fragmento estudiado corresponde aproximadamente el 43% del total del gen COI y el 4.3% del ADNmt total (Tabla 3.1).

La **tabla 3.3** muestra las secuencias alineadas de ocho individuos seleccionados aleatoriamente de cada una de las poblaciones muestreadas; las secuencias son de 3'-5', debido a que se amplificó en el sentido del iniciador HCO. Así, los nucleótidos 1 y 660 corresponden a las posiciones 2157 y 1498 complementarias de la secuencia de *Drosophila yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985). La ubicación de los tripletes se indican subrayándose y, cuya traducción de aminoácidos se hace de 5'-3'.

La diversidad nucleotídica intrapoblacional (II) de las secuencias del COI varió de 0.0072 a 0.0162, para Marina del Rey y Laguna de Guerrero Negro, respectivamente con un promedio de 0.134 ± 0.009 e.e. (Tabla 3.4). Respecto a la diversidad nucleotídica interpoblacional, ésta varió de 0.0081 a 0.1692, la cual correspondió a Marina del Rey-Estero Punta Banda y Yaquina Bay-Ensenada de La Paz, promediando 0.084 ± 0.011 e.e.; los valores más bajos se presentaron entre las poblaciones de Marina del Rey, Sunset Beach, Mission Bay, Estero Punta Banda y Laguna de Guerrero

Negro; mientras las más altas se dieron en las poblaciones de Yaquina Bay, San Francisco Bay y Ensenada de La Paz (**Tabla 3.4**). De forma correspondiente, este mismo patrón se observa con la diversidad nucleotídica estandarizada (π ; **Tabla 3.5**) y el número promedio de nucleótidos diferentes (f ; **Tabla 3.6**).

Las secuencias de aminoácidos codificados, basados en los 220 codones del COI, difirieron de 3-10 substituciones no sinónimas. Los sitios que mostraron cambios (reemplazo) en la secuencia de aminoácidos fueron 14, los intercambios ó substituciones fueron: laucina-isoleucina; serina-asparaginina; isoleucina-valina; metionina-leucina; valina-isoleucina; alanina-valina; metionina-isoleucina; metionina-isoleucina-leucina; ácido aspártico-ácido glutámico; serina-alanina; valina-leucina; alanina-serina, y serina-glicina (**Tabla 3.7**). En algunas de las restantes fueron reemplazos sinónimos (silenciosos).

La **figura 3.3** muestra los resultados del análisis de parsimonia donde se generaron 25 topologías similares. Con cien remuestreos Bootstrap se observan cuatro clados bien diferenciados, con bajos niveles de divergencia intraclados. Las poblaciones de Yaquina Bay (Oregon) y San Francisco Bay (norte de California) resultan ser los clados más divergentes, con un promedio del 23% de diferencias de pares no corregidos; las poblaciones localizadas del sur de California a la parte central de Baja California como son Marina del Rey, Sunset Beach, Mission Bay, Estero Punta Banda y Laguna de Guerrero Negro, y la de Ensenada de La Paz, conformaron dos

clados adicionales menos divergentes, promediando cerca del 7%. Adicionalmente, se observa el mismo tipo de estructuración al aplicar el análisis estadístico de conglomerados por el método del vecino más distante (Complete Linkeage, CLINK; Fig. 3.4) de la distancia Euclidiana, el cual presenta un coeficiente de correlación cofenética de 0.964.

El análisis molecular de variación (AMOVA), locus por locus, en base a los 263 loci polimórficos revelados por las secuencias de los organismos muestreados de las ocho poblaciones (localidades), muestra una diferencia estadística muy significativa ($P=0.0024$) entre los cuatro grupos de poblaciones (clados), con una componente de varianza ($\sigma_a^2 = 62.68245$) del 92.8%.

Se presentó un grado de diferenciación interpoblacional dentro de los cuatro clados de *Acartia californiensis* (F_{ST}) de 0.948 (Tabla 3.8), el cual es muy significativo ($P=0.002$). La migración estimada (flujo genético= $N_e m$) fue de 0.014 y una distancia genética promedio estimada, $D=2.956$.

Para el clado conformado por las poblaciones localizadas al sur de California y parte central de California (MR, SB, MB, PB, GN), de los 53 loci polimórficos, no existió diferencia estadísticamente significativa ($P=0.1058$); se obtuvo, además una componente de varianza ($\sigma_a^2 = 1.29243$) de 26.5% del total observado; se estimó el estadístico $F_{ST} = 0.265$ ($P=1.000$;Tabla 3.9) y el flujo génico fue $N_e m = 0.693$. La distancia genética promedio estimada resultó ser $D = 0.0308$.

Los resultados del AMOVA para las poblaciones ubicadas al sur de California (MR, SB, MB, PB), de los 39 loci polimórficos revelados no existió diferencia estadística ($P=0.2629$); la componente de la varianza ($\sigma_a^2 = 0.43190$) correspondió al 11.6% de la variabilidad explicada; los resultados mostraron un estadístico $F_{ST} = 0.116$ ($P=1.000$; **Tabla 3.10**), y un flujo génico de $N_e m = 1.905$, además de una distancia genética promedio estimada en $D=0.123$.

Para las dos poblaciones localizadas en los extremos norte y sur de la distribución geográfica de *A. californiensis* (YB, LP), de los 183 loci polimórficos resultantes, el AMOVA mostró una diferencia estadística muy significativa ($P=0.0037$) la cual corresponde al 96.5% de la variabilidad total observada entre estas localidades; por otro lado, el valor del estadístico fue $F_{ST} = 0.965$ ($P \ll 0.001$; **Tabla 3.11**) y un flujo génico $N_e m = 0.009$. La distancia genética promedio estimada fue de $D=3.352$.

Para el caso de las dos poblaciones localizadas al extremo norte (YB, SF), el análisis AMOVA mostró una diferencia altamente significativa ($P \ll 0.001$), que representó un 95.7% de la variabilidad total; el estadístico $F_{ST} = 0.957$ ($P \ll 0.001$; **Tabla 3.12**) y un flujo génico $N_e m = 0.011$. La distancia genética promedio estimada fue, $D=3.147$.

III.4. Discusión

El análisis de secuenciación del ADNmt en el gen COI mostró suficiente poder de resolución para determinar la variación molecular y

distinguir las diferencias entre las poblaciones geográficas del copépodo calanoide marino *Acartia californiensis* en la costa del Pacífico Nororiental.

Los resultados son concuerdan con otros estudios en los cuales se han utilizado el gen COI para analizar la variabilidad entre poblaciones de un copépodo harpacticoide (Burton y Lee, 1994), entre especies de insectos (Brown *et al.*, 1994; Juan *et al.*, 1995; Pederson, 1996; Stauffer *et al.*, 1997) y en un diverso grupo de invertebrados (Folmer *et al.*, 1994); aunque la cantidad de diferencias en las secuencias asociadas con las comparaciones de las especies difirieron entre los taxa estudiados.

La sistemática tradicional en los copépodos contiene una gran cantidad de grupos de especies emparentadas las cuales presentan características morfológicas apenas perceptibles y que de manera rutinaria las hace muy difícil de distinguir, como lo son las especies hermanas. Por otro lado, es muy probable que se presenten especies crípticas las cuales son especies con características genéticas divergentes, pero sin una considerable diferenciación morfológica.

En estudios sobre la filogenia del género *Greya* (Lepidoptera: Prodoxidae), Brown *et al.* (1994) encontraron una notable congruencia entre la variabilidad en las secuencias de COI y COII, con los análisis cladísticos empleando los datos de características morfológicas. No obstante, la variación de las secuencias dentro de cada especie, en particular, la secuencia del COI, ha resultado tener un valor taxonómico en la sistemática a nivel molecular porque es útil para la identificación y discriminación de especies con aparente ausencia de rasgos ó caracteres morfológicos

distintivos (Bucklin *et al.*, 1999). El cuidadoso diseño de los cebadores ó cebadores oligonucleótidos resulta ser ahora una valiosa metodología de análisis con valor taxonómico para biólogos, ecólogos y oceanógrafos.

Dos estudios recientes han demostrado la utilidad del estudio de la sistemática molecular en copépodos planctónicos marinos. Bucklin *et al.* (1995, 1997) muestran la diferenciación entre *Pseudocalanus moultoni* y *P. newmani* como especies hermanas. En otro, Bucklin *et al.* (1996) revelaron que en el océano Atlántico norte, *Nannocalanus minor* resultó ser dos especies distintas y no una, por lo cual se les difiere actualmente como especies crípticas.

En teoría, el grado de resolución de la estructura genética poblacional debería ser más sensible con la presencia de un número de haplotipos moderadamente abundante. Si esto no se presenta, como es el caso de la presente investigación, el análisis se limita al estudio de las sustituciones de bases, considerados loci, que exhiben un nivel de variabilidad alto (polimorfismo) que, de acuerdo a Excoffier *et al.* (1992), no viola ninguno de los supuestos de la teoría genética poblacional. Así, el análisis AMOVA aplicado en este estudio reveló una fuerte estructuración entre las ocho poblaciones de *Acartia californiensis* estudiadas en la costa nororiental del Pacífico ($P=0.002$; **Tabla 3.8**), entre las ubicadas en los extremos norte (Yaquina Bay, Oregon) y sur (Ensenada de La Paz, Baja California Sur) de la distribución geográfica de la especie ($P<<0.001$; **Tabla 3.11**), y entre las dos del extremo norte (Yaquina Bay, Oregon; San Francisco Bay, California) [$P<<0.001$; **Tabla 3.12**]; aspecto que claramente se muestran en los

dendogramas heurísticos de máxima parsimonia y de agrupamiento por distancias (**Figuras 3.3-4**), con los cuatro clados revelados. No así entre las poblaciones localizadas al sur de California-centro de Baja California (Marina del Rey, Sunset Beach Marina, Mission Bay, California: Estero Punta Banda, Baja California y Laguna de Guerrero Negro, Baja California Sur) [$P=1.000$; **Tabla 3.9**]; incrementándose muy poco cuando se elimina la información de los individuos de la Laguna de Guerrero Negro ($P=1.000$; **Tabla 3.10**).

El análisis bootstrapping por máxima parsimonia con 100 remuestreos determinó una significancia para el nodo de distinción del 100% para Yaquina Bay, San Francisco Bay y Ensenada de La Paz con respecto a las otras; 100 % para Marina del Rey-Sunset Beach Marina-Mission Bay-Estero Punta Banda-Laguna de Guerrero Negro respecto a las otras; y del 50% para Laguna de Guerrero Negro dentro de este último clado.

Basados en el estadístico de la estructura genética, F_{ST} , se estima que el número promedio de individuos que migran entre dos poblaciones por generación ($N_e m$), presenta valores mayores a 1 los cuales son típicos de especies con un "alto flujo genético"; con base a estos valores, es probable que tiendan a ser genéticamente homogéneos debido a la ausencia de fuerzas que contraactúen; por otro lado, es posible que nulifique la deriva génica debido a que se introducen genes nuevos a la población. Aunque las fuerzas contraactantes, como la selección diferencial, puede ser muy intensa, es probable que mantenga la diferenciación poblacional en presencia de un flujo genético con $N_e m = 1$.

En el caso de *Acartia californiensis*, el clado con una significativa homogenización, denominado sur de California y centro de Baja California, mostró un flujo genético ($N_e m$) de 0.693 y 1.905, con la presencia y ausencia de la población Laguna de Guerrero Negro, respectivamente. No es así para el resto de los clados con $N_e m = 0.009$ entre Yaquina Bay y Ensenada de La Paz, y $N_e m = 0.011$ entre Yaquina Bay y San Francisco Bay.

Al hacer una comparación de la diversidad nucleotídica interpoblacional no estandarizada con la especie congénica *Acartia tonsa* por la amplificación de la secuencia de la región mitocondrial 16S ARNr de 200 pb, de poblaciones estuarinas de la costa atlántica de EE.UU. (Caudill, 1995; Bucklin *et al.*, 1998b), ésta varió de 0 a 0.0572, con un promedio de 0.0243 para todas las poblaciones; en la presente investigación, *A. californiensis* resultó ser variable, con un rango de 0.0072 a 0.1692, y con un promedio de 0.134 ± 0.009 e.e. para todas las poblaciones.

III.5. Referencias

- Avise, J. C. (1992). Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos*, 63: 62-76.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avise, J. C., Gibling-Davidson, C., Laerm, J., Patton, J. C. y Lansman, R. A. (1979). Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, 76: 6694-6698.
- Avise, J. C., Arnold, J. A., Ball, R. M., Berminham E., Lamb T. J., Neigel, E., Reeb, C. A. y Saunders, N. C. (1987). Intraespecific phylogeography: the

- mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489-522.
- Berminham, E. y Lessios, H. A. (1993). Rate variation of protein and mitochondrial DNA evolution as revealed by sea urchins separated by the Isthmus of Panama. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*, 90: 2734-2738.
- Birky, C. W., Fuerst, P. y Maruyama, T. (1989). Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, 121: 613-627.
- Bradford, J. M. (1988). Review of the taxonomy of the Calanidae (Copepoda) and the limits to the genus *Calanus*. *Hydrobiol.*, 167:73-81.
- Brown, W. M. (1985). The mitochondrial genome of animals. En: *Molecular Evolutionary Genetics*. R. J. MacIntyre (ed.). Plenum Press, New York, pp. 95-130.
- Brown, W. M., George, M. Jr. y Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 76: 1967-1971.
- Brown, J. M., Pellmyr, O., Thompson, J. N. y Harrison, R. G. (1994). Phylogeny of *Greya* (Lepidoptera: Prodoxidae), based on nucleotide sequence variation in mitochondrial cytochrome oxidase I and II: congruence with morphological data. *Mol. Biol. Evol.* 11:128-141.
- Bucklin, A. y Kocher, L. (1996). Source regions for recruitment to Georges Bank: evidence from molecular population genetic analysis of mtDNA. *Deep-Sea Res.*, 43: 1665-1681.
- Bucklin, A. y Kann, L. (1991). Mitochondrial DNA variation of copepods: markers of species identity and population differentiation in *Calanus*. *Biol. Bull.*, 181: 357.
- Bucklin, A., Frost, B. W. y Kocher, T. D. (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial 16s rRNA in *Calanus* (Copepoda; Calanoida): intraspecific and interspecific patterns. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 397-407.

- Bucklin, A., Frost, B. W. y Kocher, T. D. (1995). Molecular systematics of seven species of *Calanus* and three species of *Metridia* (Copepoda: Calanoida). *Mar. Biol.*, 121: 655-664.
- Bucklin, A., Sundt, R. y Dahle, G. (1996). The population genetics of *Calanus finmarchicus* in the North Atlantic. Proceedings of the ICES Workshop for a TransAtlantic Study of *Calanus finmarchicus*. *Ophelia*, 44: 29-45.
- Bucklin, A., Hill, R. S. y Guarnieri, M. (1997a). Seasonal patterns of distribution and abundance of the copepods, *Pseudocalanus moultoni* and *P. newmani*, on Georges Bank: evidence for a dynamic balance between retention and loss. Background paper for Internat. Consortium Study of Sea, 1997 Scientific Meeting, ICES CM 1997/T:06.
- Bucklin, A., Smolenack, S. B., Bentley, A. M. y Wiebe, P. H. (1997b). Gene flow patterns of the euphausiid, *Meganyctiphanes norvegica*, in the N. Atlantic based on DNA sequences for mitochondrial cytochrome oxidase I and cytochrome b. *J. Plank. Res.*, 19:1763-1781.
- Bucklin, A., Bentley, A. M. y Franzen, S. P. (1998a). Distribution and relative abundance of the copepods, *Pseudocalanus moultoni* and *P. newmani*, on Georges Bank based on molecular identification of sibling species. *Mar. Biol.*, 132:97-106.
- Bucklin, A., Caudill, C. C. y Guarnieri, M. (1998b). Population genetics and phylogeny of marine planktonic copepods. En: *Molecular Approaches to the Study of the Ocean*, Chapter 14. K.C. Cooksey (ed.). Chapman & Hall, London, U.K. pp. 303-317.
- Bucklin, A., Guarnieri, M., Hill, R.S., Bentley, A.M. y Kaartvent, S. (1999). Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. Special Issue, *Molecular Ecology of Aquatic Communities* (J.P. Zehr y M. Voytek, Eds.). *Hydrobiol.*, 401:239-254.
- Bucklin, A., Guarnieri, M., McGillicuddy, D. y Hill, R.S. (2000a). Spring-summer evolution of *Pseudocalanus* spp. abundance on Georges Bank

- based on molecular discrimination of *P. moultoni* and *P. newmani*. Deep-Sea Res. (In press)
- Bucklin, A., Smolenack, S. B., Pierson, J. J. y Wiebe, P. H. (2000b). Population genetic diversity and structure of the euphausiid, *Stylocheiron elongatum*, in the Gulf Stream, with a molecular phylogeny of six *Stylocheiron* species. (In review)
- Burton, R. S. (1994). Inferring the genetic structure of marine populations: a case study comparing allozyme and DNA sequence data. CalCOFI Rep., 35: 52-60.
- Burton, R. S. (1998). Intraespecific phylogeography across the Point Conception biogeographic boundary. Evolution, 52: 734-745.
- Burton, R. S. y Lee, B.-N. (1994). Nuclear and mitochondrial gene genealogies and allozyme polymorphism across a major phylogeographic break in the copepod *Tigriopus californicus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 5197-5201.
- Carr, S. M. y Marshall, H. D. (1991a). A direct approach to the measurement of genetic variation in fish populations: application of the polymerase chain reaction to studies of Atlantic cod *Gadus morhua* L. J. Fish Biol., 39: 101-107.
- Carr, S. M. y Marshall, H. D. (1991b). Detection of intraspecific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by the polymerase chain reaction. Can. J. Fish. Aqua. Sci., 48: 48-52.
- Caudill, C. C. (1995). Molecular evidence of population genetic differentiation and sibling species in *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida). Master's thesis, Department of Zoology, University of New Hampshire, Durham, NH.
- Chu, K. H., Tong, J y Chan, T. Y. (1999). Mitochondrial cytochrome oxidase I sequence divergence in some Chinese species of *Charybdis* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). Bioch. Syst. Ecol., 27: 461-468.

- Clary, D. O. y Wolstenholme, D. R. (1985). The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. Mol. Evol.* 22: 252-271.
- Crease, T. J. (1999). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene*. (In press)
- Cunningham, C. W., Blackstone, N. W. y Buss, L. W. (1992). Evolution of king crabs from hermit crab ancestors. *Nature*, 355: 539-542.
- Edmands, S., Moberg, P. E. y Burton, R. S. (1996). Allozyme and mitochondrial DNA evidence of population subdivision in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Mar. Biol.*, 126: 443-450.
- Edwards, C. A. y Skibinski, D. O. F. (1987). Genetic variation of mitochondrial DNA in mussel (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) populations from South West England and South Wales. *Mar. Biol.*, 94: 547-556.
- Excoffier, L., Smouse, P. y Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes. Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 136: 479-491.
- Finnerty, J. R. y Block, B. A. (1992). Direct sequencing of mitochondrial DNA detects highly divergent haplotypes in blue marlin (*Makaira nigricans*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 206-214.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3: 294-299.
- Frost, B.W. y Fleminger, A. (1968). A revision of the genus *Clausocalanus* (Copepoda: Calanoida) with remarks on distributional patterns in diagnostic characters. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.*, 12:1-235.
- Ghosh, S. y Campbell, A. M. (1988). Unusual cross-reactons among monoclonal antibodies to bacterial antigen: Idiotypic and competitive binding analysis. *Microbiol. Immunol.*, 1: 3-8.

- Gold, J. R. y Richardson, L. R. (1991). Genetic studies of marine fishes. IV. An analysis of population structure in the red drum (*Sciaenops ocellatus*) using mitochondrial DNA. *Fish. Res.*, 12: 213-241.
- Grijalva-Chon, J. M., Numachi, K., Sosa-Nishizaki, O. y de la Rosa-Velez, J. (1994). Mitochondrial DNA analysis of North Pacific swordfish *Xiphias gladius* population structure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 115: 15-19.
- Guarnieri, M. (1996). A preliminary study of genetic variation within and among populations of *Diaptomis leptopus* (Copepoda: Calanoida): a DNA sequence analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene. M. Sc. Thesis, Dept. Biology, Concordia University, Montreal, Quebec.
- Harasewych, M. G., Adamkewicz, S. L., Blake, J. A., Saudek, D., Sproggs, T. y Bult, C. J. (1997). Phylogeny and relationships of pleurotomariid gastropods (Mollusca: Gastropoda): an assessment based on partial 18S rDNA and cytochrome c oxidase I sequences. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 6: 1-20.
- Hoelzel, A. R. y Green, A. (1992). Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. En: A. R. Hoelzel (ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White, T. J. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego.
- Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H. y Brow, M. A. D. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 85: 9436-9440.
- Jacobs, H.T. y Grimes, B. (1986). Complete nucleotide sequences of the nuclear pseudogenes for cytochrome oxidase subunit I and the large mitochondrial ribosomal RNA in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Mol. Biol.*, 187:509-527.
- Joenje, H. (1989). Genetic toxicology of oxygen. *Mutation Res.*, 219:193-208.

- Juan, C., Oromi, P. y Hewitt, G. M. (1995). Mitochondrial DNA phylogeny and sequential colonization of Canary Islands by darkening beetles of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae). *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 261:173-180.
- Kann, L. M. y Wisner, K. (1996). Genetic structure of the copepod *Calanus finmarchicus* in the Gulf of Maine: allozyme and amplified mitochondrial DNA variation. *Mar. Biol.*, 125: 65-75.
- Karl, S. A. y Avise, J. C. (1992). Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLP's. *Science*, 256: 1629-1632.
- Knowlton, N., Weigt, L. A., Solórzano, L. A., Mills, D. K. y Bermingham, E. (1993). *Science*, 260: 1629-1632.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X. y Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 86: 6196-6200.
- Kornfield, I. y Bogdanowicz, S. M. (1987). Differentiation of mitochondrial DNA in Atlantic herring *Clupea harengus*. *Fish. Bull.*, 85: 561-568.
- Lee, C. E. (En prensa). Rapid and repeated invasions of fresh water by the copepod *Eurytemora affinis*. *Evolution*.
- Lunt, D.H., Zhang, D.X., Szymura, J. M. y Hewitt, G. M. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect. Mol. Biol.*, 5:153-165.
- Medina, M., Weil, E. y Szmant, A. M. (1999). Examination of the *Montastraea annularis* species complex (Cnidaria: Scleractina) using ITS and COI sequences. *Mar. Biotechnol.*, 1: 89-97.
- McBride, L. J., Koepf, S. M., Gibbs, R. A., Saiser, W., Mayrand, P. E., Hunkapiller, M. W. y Kronick, M. N. (1989) Automated DNA sequencing methods involving polymerase chain reaction. *Clin. Chem.*, 35: 2196-2201.
- McMillan, W. O., Raff, R. A. y Palumbi, S. R. (1992). Population genetic consequences of developmental evolution in sea urchins (genus *Heliocidaris*). *Evolution*, 46: 1299-1312.

- Michalakis, Y. y Excoffier, L. (1996). A genetic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to microsatellite loci. *Genetics*, 142: 1061-1064.
- Ovenden, J. R. (1990) Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Australian J. Mar. Fresh. Res.*, 41: 835-853.
- Palumbi, S. R. (1996). Microspatial genetic structure and speciation in marine taxa with high dispersal abilities. En: J. D., Ferraris y S. R., Palumbi (eds.), *Molecular Zoology, Advances, Strategies and Protocols*, Wiley-Liss, New York, pp. 101-117.
- Palumbi, S. R. y Brand, C. W. (1993). Mitochondrial DNA variability within and between species of Penaeid shrimp. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 2.
- Palumbi, S. R. y Kessing, B. D. (1991). Population biology of the trans-Arctic exchange: mtDNA sequence similarity between Pacific and Atlantic sea urchins. *Evolution*, 45: 1790-1805.
- Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L. y Grabowski, G. (1991). *The simple fool's guide to PCR (Ver. 2)*, Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu.
- Pedersen, B. V. (1996). A phylogenetic analysis of cuckoo bumblebees (*Psithyrus*, Lepeletier) and bumblebees (*Bombus*, Latreille) inferred from sequences of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 5:289-297.
- Reeb, C. A. y Avise, J. C. (1990). A genetic discontinuity in a continuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Genetics*, 124: 397-406.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. y Erlich, H. A. (1988). Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostabile DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Saunders N.C., Kessler, L. G. y Avise, J. C. (1986). Genetic variation and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horseshoe crab *Limulus polyhemus*. *Genetics*, 112: 613-627.

- Schneider, S., Roessli, D. y Excoffier, L. (2000). Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. Free distribution by Internet at <http://anthro.unige.ch/arlequin>
- Smith, L. M., Sanders, J. Z. y Kaiser, R. J. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321: 674-679.
- Stauffer, C., Lakatos, E. y Hewitt, G. M. (1997). The phylogenetic relationships of seven European Ips (Scolytidae, Ipinae) species. *Insect. Mol. Biol.*, 6:233-240.
- Stott, W., Ferguson, M. y Tallman, R. F. (1992). Genetic population structure of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) from the Gulf of St Lawrence, Canada. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.*, 49: 2583-2445.
- Swofford, D. L. (1998). PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (Version 4.0). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Taanman, J. W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1410: 103-123.
- Weir, B. S. y Cockerham, C. C. (1984). Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Workman, P. L. y Niswander, J. D. (1970). Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *Am. J. Hum. Genet.*, 22: 24-29.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.*, 15:323-354.
- Xiong, B. y Kocher, T. D. (1991). Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome*, 34: 306-311.
- Zwanenburg, K. C. T., Bentzen, P. y Wright, J. M. (1992). Mitochondrial DNA differentiation in western North Atlantic populations of haddock (*Malanogrammus aeglefinus*). *Can. J. Fish. Aqua. Sci.*, 49: 2527-2537.

III.6. Figuras y Tablas

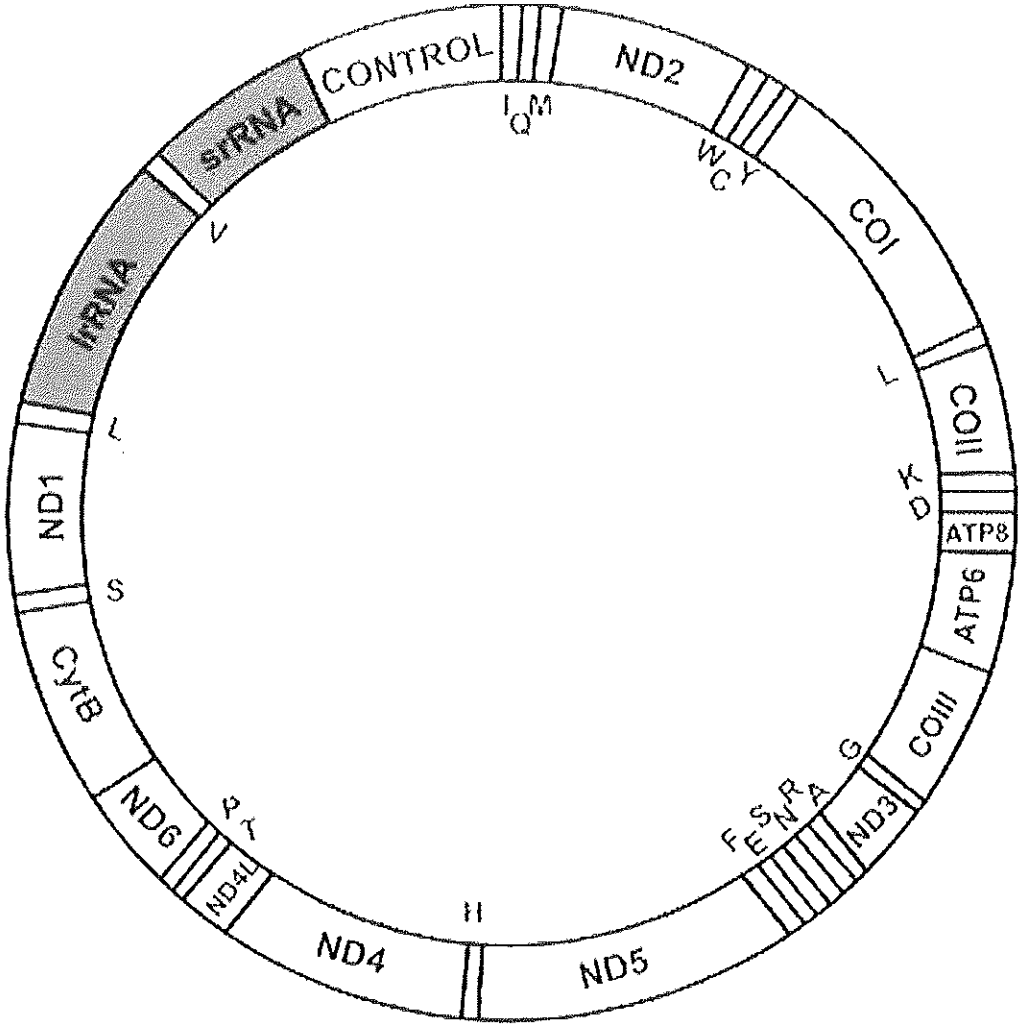


Figura 3.1. Modelo del mapa genético del ADNmt del cladócer *Daphnia pulex* (Crease, 1999).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

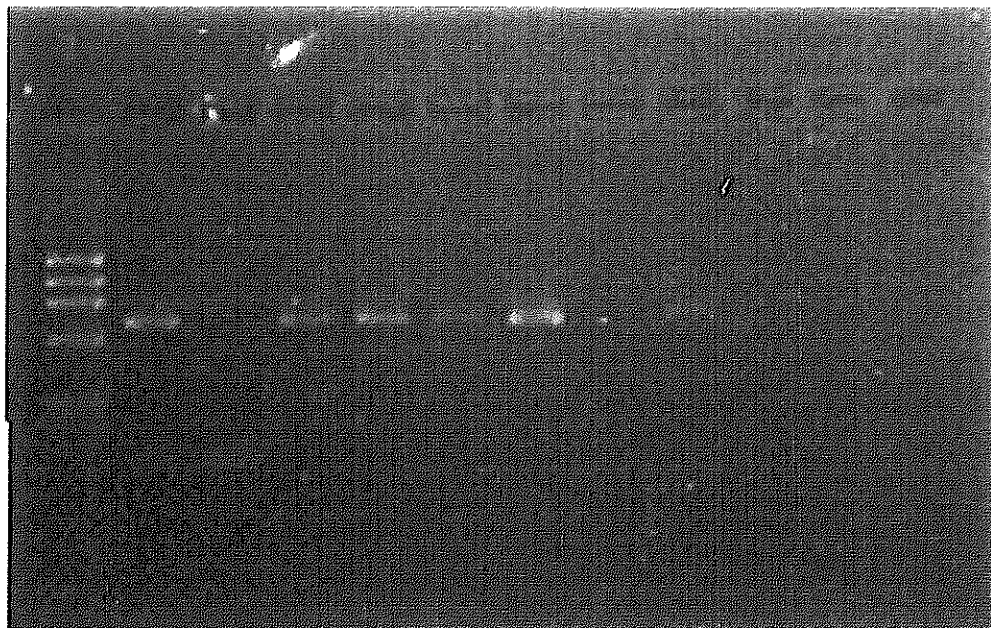


Figura 3.2. Detección de cantidad y calidad del gene ADNmt COI por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo iluminación UV. De izquierda a derecha: 1) control positivo ϕ X174/*Hae*III; 2) SB21; 3) YB22; 4) MR23; 5) MR25; 6) SB22; 7) SB24; 8) LP22; 9) LP25; 10) YB21; 11) YB24, y 12) control negativo (última aplicación). En negritas se indican las muestras seleccionadas.

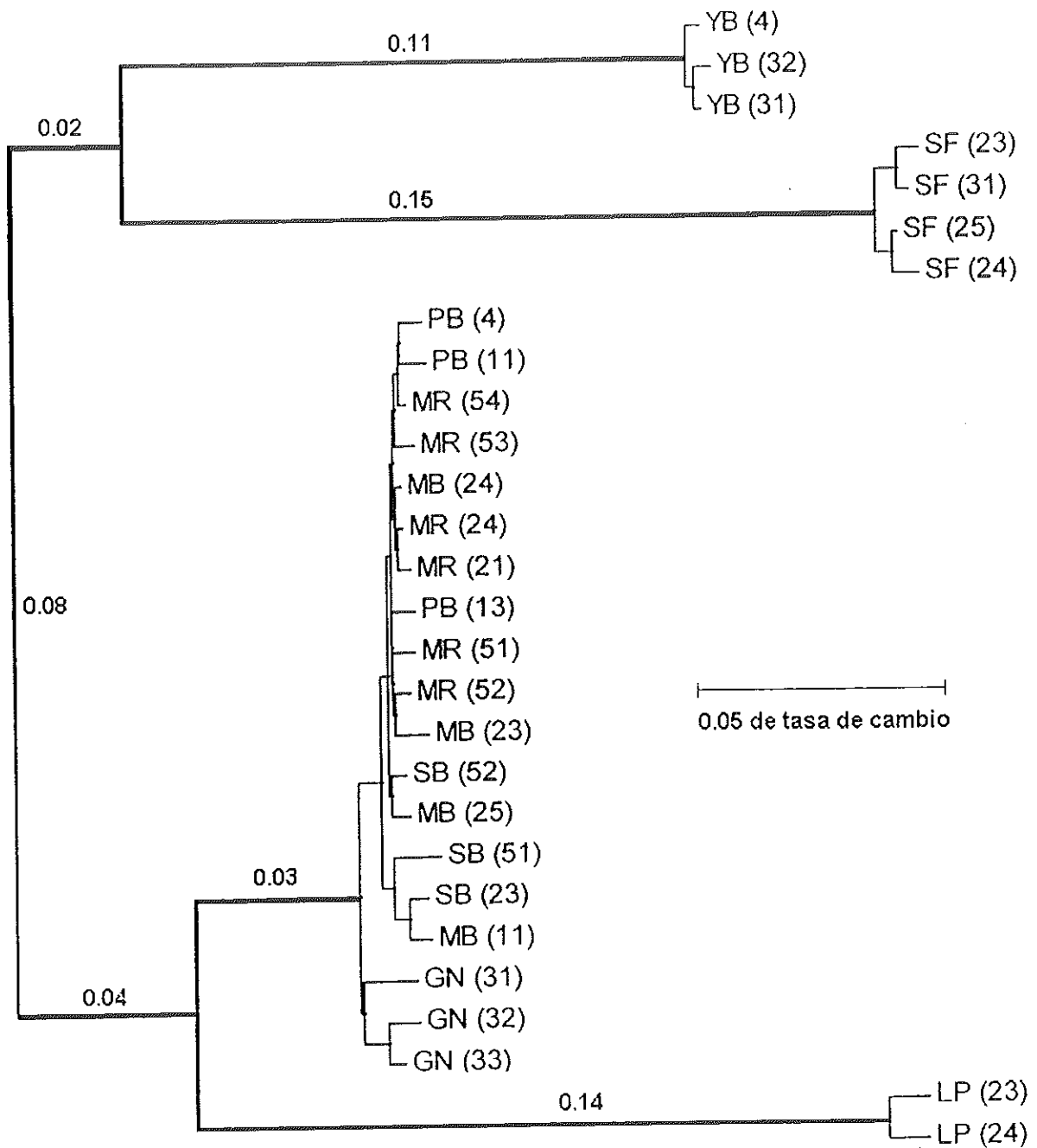


Figura 3.3. Árbol filogenético propuesto para las poblaciones estudiadas del copépodo calanoide *Acartia californiensis* de la costa nororiental del Pacífico, con base a la secuenciación del gene ADNmt COI. Los nombres indican la secuencia de la población y el número refiere al organismo. La longitud de las ramas representa el número relativo de sustituciones (cambios). Las líneas gruesas revelan el valor de la significancia Bootstrapping >95%.

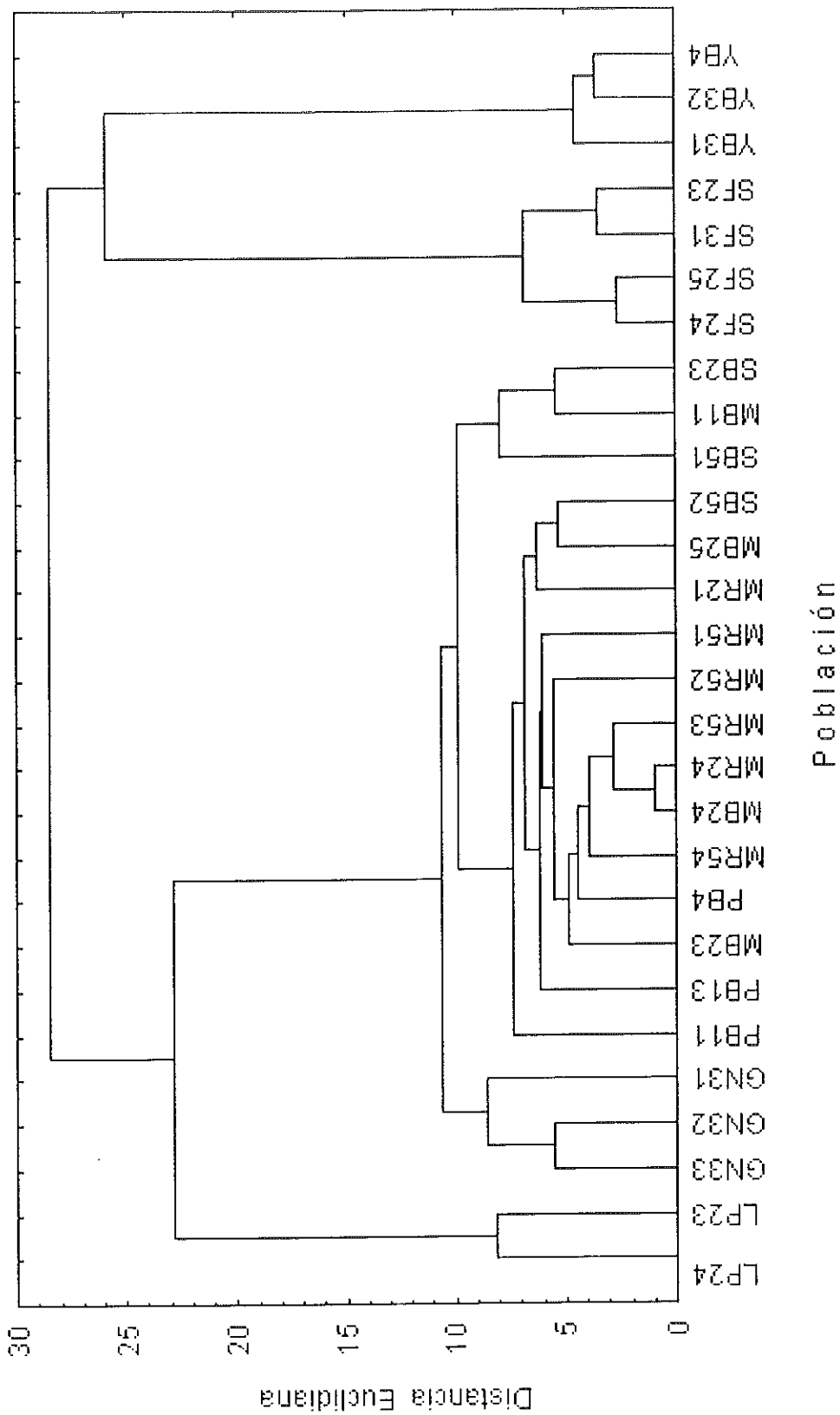


Figura 3.4. Dendrograma de las poblaciones del copepodo calanoide *Acartia californiensis* de la costa nororiental del Pacífico, con base a la secuenciación del gene ADNmt COI. Se utilizó análisis de conglomerados por el método CLINK (del vecino más distante) de las distancias Euclidianas.

Tabla. 3.1. Organización del genoma mitocondrial del cladóceros *Daphnia pulex*. En negritas se muestra el gene estudiado en este trabajo de investigación (Crease, 1999).

Gene	Principia	Termina	Longitud	Inicio	Fin
TARN ^{Ile}	1	64	64		
TARN ^{Gln}	66	133	68		
TARN ^{Met}	134	197	64		
ND2	198	1185	988	ATG	T - -
TARN ^{Trp}	1186	1251	66		
tARN ^{Cys}	1253	1316	64		
tARN ^{Tyr}	1328	1391	64		
COI	1397	2934	1538	ATTA	T - -
tARN ^{Leu} (UUR)	2935	3002	68		
COII	3004	3682	679	ATG	T - -
tARN ^{Lys}	3683	3752	70		
tARN ^{Asp}	3757	3821	65		
ATPasa8	3821	3982	162	GTG	TAG
ATPasa6	3976	4649	674	ATG	TA -
COIII	4650	5438	789	ATG	TA -
tARN ^{Gly}	5439	5499	61		
ND3	5500	5852	353	ATT	TA -
tARN ^{Ala}	5853	5918	66		
tARN ^{Arg}	5920	5984	65		
tARN ^{Asn}	5985	6051	67		
tARN ^{Ser} (AGN)	6052	6116	65		
tARN ^{Glu}	6117	6184	68		
tARN ^{Phe}	6184	6249	66		
ND5	6250	7957	1708	ATG	T - -
TARN ^{His}	7952	8015	64		
ND4	8016	9336	1321	ATG	T - -
ND4I	9339	9614	276	ATT	TAA
tARN ^{Thr}	9664	9710	65		
tARN ^{Pro}	9711	9775	65		
ND6	9778	10290	513	ATT	TAA
CytB	10298	11431	1134	ATG	TAA
tARN ^{Ser} (UCN)	11432	11500	69		
ND1	11491	12426	936	ATG	TAA
tARN ^{Leu} (CUN)	12430	12496	67		
LSU rARN	12506	13819	1314		
tARN ^{Val}	13821	13892	72		
SSU rARN	13892	14644	753		
Región Control	14645	15333	689		
Total			15280		

Tabla 3.2. Especies de copépodos a los que se ha secuenciado el gen COI, de acuerdo al banco de datos de nucleótidos por Internet, GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information)

Calanoida	
Acartiidae	
	Acartia
	<i>Acartia tonsa</i>
Calanidae	
	Calanoides
	<i>Calanoides acutus</i>
	<i>Calanoides macrocannatus</i>
	Calanus
	<i>Calanus australis</i>
	<i>Calanus chilensis</i>
	<i>Calanus finmarchicus</i>
	<i>Calanus glacialis</i>
	<i>Calanus helgolandicus</i>
	<i>Calanus hyperboreus</i>
	<i>Calanus marshallae</i>
	<i>Calanus pacificus</i>
	<i>Calanus similimus</i>
	<i>Calanus sinicus</i>
	Cosmocalanus
	<i>Cosmocalanus darwinii</i>
	Ctenocalanus
	<i>Ctenocalanus citer</i>
	<i>Ctenocalanus vanus</i>
	Mesocalanus
	<i>Mesocalanus tenuicornis</i>
	Nannocalanus
	<i>Nannocalanus minor</i>
	Neocalanus
	<i>Neocalanus cristatus</i>
	<i>Neocalanus flemingeri</i>
	<i>Neocalanus plumchrus</i>
	<i>Neocalanus tonsus</i>
	Undinula
	<i>Undinula vulgaris</i>
Centropagidae	
	Centropages
	<i>Centropages hamatus</i>
Clausocalanidae	
	Clausocalanus
	<i>Clausocalanus arcuicornis</i>
	<i>Clausocalanus brevipes</i>
	<i>Clausocalanus farrani</i>
	<i>Clausocalanus furcatus</i>
	<i>Clausocalanus ingens</i>
	<i>Clausocalanus jobei</i>
	<i>Clausocalanus laticeps</i>
	<i>Clausocalanus lividus</i>
	<i>Clausocalanus mastigophorus</i>
	<i>Clausocalanus minor</i>
	<i>Clausocalanus parapergens</i>
	<i>Clausocalanus paululus</i>
	<i>Clausocalanus pergens</i>
	Drepanopus
	<i>Drepanopus forcipatus</i>
	Pseudocalanus
	<i>Pseudocalanus acuspes</i>
	<i>Pseudocalanus elongatus</i>
	<i>Pseudocalanus minutus</i>
	<i>Pseudocalanus moultoni</i>
	<i>Pseudocalanus newmani</i>
	<i>Pseudocalanus</i> sp. Oceanus 341
Euchaetidae	
	Euchaeta
	<i>Euchaeta acutifrons</i>
	Paraeuchaeta
	<i>Paraeuchaeta norvegica</i>
Metridinidae	
	Gaussia
	<i>Gaussia</i> sp. MBARI 1
	Metridia
	<i>Metridia lucens</i>
Scolecithricidae	
	Scolecithricella
	<i>Scolecithricella minor</i>

Tabla 3.3. Consensos de la secuencia 5'-3' del ADN para la región de 660 pb del gene mitocondrial COI amplificada por PCR para los individuos seleccionados de las poblaciones del copepodo calanoides marino *Acartia californiensis* de la costa nororiental del Pacífico. Los nucleótidos 1 y 660 corresponden a las posiciones 1498 y 2157, de la secuencia de *Drosophila yakuba* (Lary y Wolstenholme, 1985). Los codones se muestran separados.

	1	10	20	30	40	50	60	70	78																
YB(4)	AAT	CAT	AAA	GAT	AAT	GGA	ACC	TTA	TAT	CTT	CCT	GCC	GGG	ATA	TGA	TCA	GGG	ATA	GTT	ACA	GGC	CTA	AGA	ATA	ATT
YB(32)																									
YB(31)																									
SF(23)																									
SF(31)																									
SF(25)																									
SF(24)																									
MR(51)																									
MR(52)																									
MR(53)																									
MR(54)																									
MR(24)																									
MR(21)																									
SB(23)																									
SB(51)																									
SE(52)																									
MB(11)																									
MB(25)																									
MB(23)																									
MB(24)																									
PB(13)																									
PB(4)																									
PB(11)																									
GN(31)																									
GN(32)																									
GN(33)																									
LP(23)																									
LP(24)																									

A, adenina; T, timina; C, citocina; G, guanina; ., nucleótido idéntico; ?, información perdida.

	391	400	410	420	430	440	450	460	468
YB(4)	GCT TCC GTA GAC TTT GCA ATT TTT TCA CTA CAC TTA GCT GGT GCA AGA TCA ATT TTA GGG GCC GTA AAC TTT ATT TCA								
YB(32)
YB(31)
SF(23)
SF(31)
SF(25)
SF(24)
MR(51)
MR(52)
MR(53)
MR(54)
MR(24)
MK(21)
SB(23)
SE(51)
SB(52)
ME(11)
MB(25)
MB(23)
MB(24)
PB(13)
PB(4)
PB(11)
GN(31)
GN(32)
GN(33)
LP(23)
LP(24)

	469	480	490	500	510	520	530	540	546
YB(6)	ACT CTG GGT AAT TTG CGC TCA TTT GGG ATA ATA APT GAC CTA ATA CCT TTA TTT TCC TGA TCA GTA GTT ATC ACT GCT								
YB(22)A...	...C...TG
YB(31)TG G.G
YB(34)A...	...A...	...T...C...	...G...GG...T	...T...A...	...A
YB(31)A...G...	...A...G...	...T...C...G...	...G...GG...T	...T...A...	...A
YB(24)A...A...	...A...A...	...T...G...C...G...	...G...T...GG...T	...T...A...	...A
YB(24)A...A...	...A...A...	...T...G...C...G...	...G...T...GG...T	...T...A...	...A
MR(11)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...A
MR(52)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
MR(53)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
MR(54)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
MR(24)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
MR(21)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
SE(23)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
SE(51)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
SE(52)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
MB(11)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
MB(25)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
MB(23)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
MB(24)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
PE(13)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
PE(4)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
PE(11)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
GN(31)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
GU(32)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
GU(33)A...T...	...T...T...	...T...G...T...A...	...T...G...T	...T...A...	...
LP(25)	CGA TC	.TA .T .AC GTT CAT	.G .TA TA .TA .?CG AGG ??? ?GGG...T	...T...A...	...
LP(24)	CGA TC	.TA .T .AC GTT CAT	.G .TA TA .TA .?CG AGG ??? ?GGG...T	...T...A...	...

	547	550	560	570	580	590	600	610	620	624											
YB(4)	GTC	TTA	TTA	TCT	TTA	GCA	GGA	GCA	ATT	ACA	ATA	TTA	CTT	ACA	GAT	GGA	AAC	TTA	AAC	TCC	TCT
YB(32)
YB(31)
SF(23)
SF(31)
SF(25)
SF(24)
MR(51)
MR(52)
MR(53)
MR(54)
MR(24)
MR(21)
SB(23)
SB(51)
SB(53)
MB(11)
MB(25)
MR(23)
MB(24)
PB(13)
PB(4)
PH(11)
GH(31)
GH(32)
GR(33)
LP(23)
LP(24)

	625	630	640	650	660
YB(4)	TTT	TAT	GAT	GCA	AGA
YB(32)
YB(31)
SF(23)
SF(31)
SF(25)
SF(24)
MR(51)
MR(52)
MR(53)
MR(54)
MR(24)
MR(21)
SB(23)
SB(51)
SB(52)
MB(11)
MB(25)
MB(23)
MB(24)
PB(13)
PB(4)
PB(11)
GN(31)
GN(32)
GU(33)
LP(23)
LP(24)

Tabla 3.4. Diversidad nucleotídica (Π) intra e interpoblacionales de *Acartia californiensis*.

	YB	SF	MR	SB	MB	PB	GN	LP
YB	0.0081							
SF	0.1392	0.0111						
MR	0.1023	0.1215	0.0072					
SB	0.1258	0.1325	0.0110	0.0141				
MB	0.1178	0.1324	0.0091	0.0131	0.0119			
PB	0.1235	0.1327	0.0081	0.0141	0.0114	0.0101		
GN	0.1261	0.1298	0.0149	0.0193	0.0185	0.0183	0.0162	
LP	0.1692	0.1602	0.0785	0.1098	0.0989	0.1108	0.1123	0.0152

Tabla 3.5. Diversidad nucleotídica estandarizada (π) intra e interpoblacional de *Acartia californiensis*.

	YB	SF	SB	MR	MB	PB	GN	LP
YB	0.0000123							
SF	0.0002109	0.0000168						
SB	0.0001906	0.0002008	0.0000214					
MR	0.0001550	0.0001842	0.0000167	0.0000109				
MB	0.0001785	0.0002001	0.0000199	0.0000138	0.0000179			
PB	0.0001872	0.0002010	0.0000214	0.0000122	0.0000173	0.0000153		
GN	0.0001910	0.0001966	0.0000292	0.0000226	0.0000279	0.0000277	0.0000245	
LP	0.0002564	0.0002427	0.0001664	0.0001189	0.0001498	0.0001678	0.0001701	0.0000229

Tabla 3.6. Número promedio de nucleótidos diferentes (f) intra e interpoblacionales de *Acartia californiensis*.

	YB	SF	SB	MR	MB	PB	GN	LP
YB	5							
SF	92	7						
SB	83	87	9					
MR	67	80	7	5				
MB	78	87	9	6	8			
PB	82	88	9	5	8	7		
GN	83	86	13	10	12	12	11	
LP	112	106	73	52	65	73	74	10

Tabla 3.7. Diferencias de aminoácidos entre los individuos-población codificados de los 220 codones secuenciados del gen ADNmt COI de *Acartia californiensis*. Se indica el lugar del aminoácido sustituido. Se muestran los aminoácidos sustituidos. Los clados están enmarcados.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80		
YB(4)	IHKDIGTLYL	L	AGI	SGIVG	TGLRIIRIE	L	QAGSLIGD	DQIYVVVTA	HAFIMIFFIV	MPILIGGFGN	WLIPLILGAA
YB(32)
YB(31)
SF(23)	V	I
SF(31)	V	I
SF(25)	V	I
SF(24)	V	I	K
MR(51)	N
MR(52)	N
MR(53)	N
MR(54)	N
MR(24)	N
MR(21)	N
SB(23)	N
SB(51)	N	I
SB(52)	N
MB(11)	N
MB(25)	N
MB(23)	N
MB(24)	N
PB(13)	N
PB(4)	N
PB(11)	N
GN(31)	N
GN(32)	N	I
GN(33)	N	I
LP(23)	N	I	M
LP(24)	N	I	M

..... aminoácido idéntico; ?; alto; ?, información perdida; A, alanina; R, arginina; N, asparagina; D, aspartato; Q, glutamina; E, glutamato; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; L, leucina; K, lisina; M, metionina; F, fenilalanina; P, prolina; S, serina; T, treonina; W, triptofano; Y, tirosina; V, valina.

	81	90	100	110	120	130	140	150	160
YB(4)	IMAFPR(N)I	RF*LLMPALV	ILJ.SRSLVES	GAGTG*TVYP	PLSRNIAHAG	ASVDFAI FSL	HLAGARSILG	AVNFISTVGN	
YB(32)									
YB(31)									
SF(23)	I	S	L	R	V	S	S	S	I
SF(31)	I	S	L	R	W	S	S	S	I
SF(25)	I	S	L	R	W	S	S	S	I
SF(24)	I	S	L	S	KR	W	S	S	I
MR(51)	I		L	I		R			I
MR(52)	I		L	I		R			I
MR(53)	I		L	I		R			I
MR(54)	I		L	I		R			I
MR(24)	I		L	I		R			I
MR(21)	I		L	I		R			I
SB(23)	I		L	I		R			I
SB(51)	I		L	I		R			I
SB(52)	I		L	I		R			I
MB(11)	I		L	I		R			I
MB(25)	I		L	I		K			I
MB(23)	I		L	I		R			I
MB(24)	I		L	I		K			I
PB(13)	I		L	I		R			I
PB(4)	I		L	I		R			I
PB(11)	I		L	I		R			I
GN(31)	I		L	I		R			I
GN(32)	I		L	I		R			I
GN(33)	I		L	I		R			I
LF(23)	I		L	I	M		SHF T.LVLDLF*	QLISSQRSVI	
LF(24)	I		L	I			SHF T.LVLDLF*	QLISSQRSVI	

	181	170	180	190	200	210	220
YB(4)	LRKFGILLDL	IPHFS*SVVI	TAVLLLLSLP	VLGAITILL	TORNLNSSFY	DARGGGDPIL	
YB(32)	...K..V.
YB(31)VV
SF(23)	...M.ME.	M.....A.L.M.G.
SF(31)	...M.ME.	M.....A.L.M.G.
SF(25)	...M.ME.	M.....A.L.M.G.
SF(24)	...M.ME.	M.....A.L.M.G.
MR(51)	...M.L.A.L.SG.
MR(52)	...M.L.A.L.SG.
MR(53)	...M.L.A.L.SG.
MR(54)	...M.L.A.L.SG.
MR(21)	...L.A.L.SG.
MR(23)	...L.A.L.SG.
SB(51)	...M.L.A.L.SG.
SB(52)	...M.L.A.L.SG.
MB(11)	...L.A.L.SG.
MB(25)	...M.L.A.L.SG.
MB(23)	...M.L.A.L.P.SG.....K
MB(24)	...L.A.L.SG.
PB(13)	...M.L.A.L.SG.
PB(4)	...M.L.A.L.P.SG.
PB(11)	...M.L.A.L.SG.
GN(31)	...M.L.A.L.SG.
GN(32)	...M.L.A.L.SG.
GN(33)	...M.L.A.L.SG.
LP(23)	VVHLV**?R?A.L.SG.....N.
LP(24)	VVHLV**?R?A.L.SG.....N.

Tabla 3.9. Análisis molecular de variación (AMOVA) locus por locus con base a los 53 loci polimórficos del fragmento del gen ADNmt. COI, de las cinco poblaciones (Sunset Beach Marina, Marina del Rey, Mission Bay, Estero Punta Banda y Laguna de Guerrero Negro) de *Acartia californiensis* localizadas al sur de California-centro de Baja California.

Fte. Var.	SC	g.l.	CM	F	P	Comp. Var	% Var.	Est. F
Entre localidades	33.539	4	8.395	2.339	0.1058 <i>ns</i>	1.29243	26.5	$F_{ST} = 0.265$ <i>ns</i>
Dentro de localidades	50.250	14	3.589			3.58929	73.5	
Total	83.789	18				4.88171	100.0	

Fte. Var., Fuente de variación; SC, suma de cuadrados; g.l., grados de libertad; CM, cuadrado medio; F, razón de varianzas; P, nivel de significancia; Comp. Var., componente de varianza; % Var., porcentaje de la variabilidad; Est. F., estadístico F; F_{ST} , grado de diferenciación genética entre poblaciones; *ns*, no significativo ($\alpha=0.01$).

Tabla 3.10. Análisis molecular de variación (AMOVA) locus por locus con base a los 39 loci polimórficos encontrados en las secuencias PCR del fragmento del gen ADNmt. COI, de las cuatro poblaciones (Sunset Beach Marina, Marina del Rey, Mission Bay y Estero Punta Banda) de *Acartia californiensis* localizadas al sur de California.

Fte. Var.	SC	g.l.	CM	F	P	Comp. Var	% Var.	Est. F
Entre localidades	14.917	3	4.972	1.507	0.2629 ns	0.43190	11.6	$F_{ST} = 0.116$ ns
Dentro de localidades	39.593	12	3.299			3.29861	88.4	
Total	54.500	15				3.73051	100.0	

Fte. Var., Fuente de variación; SC, suma de cuadrados; g.l., grados de libertad; CM, cuadrado medio; F, razón de varianzas; P, nivel de significancia; Comp. Var., componente de varianza; % Var., porcentaje de la variabilidad; Est. F., estadístico F; F_{ST} , grado de diferenciación genética entre poblaciones; ns, no significativo ($\alpha=0.01$).

Tabla 3.11. Análisis molecular de variación (AMOVA) locus por locus con base a los 180 loci polimórficos del fragmento del gen ADNmt, COI, de las dos poblaciones más distantes (Yaquina Bay, Oregon-Ensenada de La Paz, Baja California Sur) del copépodo calanoide marino *Acartia californiensis*.

Fte. Var.	SC	g.l.	CM	F	P	Comp. Var	% Var.	Est. F
Entre localidades	203.400	1	203.400	67.8	0.0037 **	83.50001	96.5	$F_{ST} = 0.965$ ***
Dentro de localidades	9.000	3	3.000			3.00000	3.5	
Total	212.400	4				86.49999	100.0	

Fte. Var., Fuente de variación; SC, suma de cuadrados; g.l., grados de libertad; CM, cuadrado medio; F, razón de varianzas; P, nivel de significancia; Comp. Var., componente de varianza; % Var., porcentaje de la variabilidad; Est. F., estadístico F; F_{ST} , grado de diferenciación genética entre poblaciones: **, muy significativo ($\alpha=0.01$); ***, altamente significativo ($\alpha \ll 0.001$).

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DE INTER E INTRACRUZAMIENTO ENTRE DOS POBLACIONES DE *Acartia californiensis*

IV.1. Introducción

La determinación del grado de aislamiento reproductivo en organismos marinos como los copépodos, por medio de experimentos de cruzamiento, son escasos debido a la dificultad de mantenerlos en condiciones de laboratorio (Carrillo-Barrios-Gómez *et al.*, 1974). Battaglia (1956) realizó experimentos exitosos de cruzamientos entre poblaciones alopátricas del copépodo harpacticoide *Tisbe reticulata* provenientes del Reino Unido y la Laguna de Venecia. Este tipo de experimentos también se han realizado entre poblaciones de *Tigriopus fulvus* (Bozic, 1960); así como intentos fallidos entre poblaciones del copépodo calanoide *Acartia clausi* del Atlántico y del Pacífico (Carrillo-Barrios-Gómez *et al.*, 1974). Más recientemente, Burton (1986, 1987, 1990), Burton y Feldman (1981) y Burton *et al.* (1979), han realizado estudios combinados de genética y cruzamientos entre poblaciones del copépodo harpacticoide *Tigriopus californicus*.

A partir de que *Acartia californiensis* es una especie de copépodo calanoide el cual es endémico de la costa del Pacífico Nororiental, ya que ha sido reportada únicamente en las partes más internas de cuerpos de aguas costeros, sin un registro que la ubique en mar abierto, se plantea la siguiente interrogante: ¿Cómo mantiene esta especie su identidad e integridad como una unidad biológica? Trujillo-Ortiz *et al.* (1995) y en el presente trabajo (Capítulos II y III). Se ha demostrado que las dos poblaciones geográficas cercanas, el Estero Punta Banda, Baja California, México y Mission Bay, California, EE.UU., son homogéneas y genéticamente similares. Esta considerable similitud se explica por la existencia de un alto flujo genético, muy probablemente dado a la dispersión pasiva de los huevos diapáusicos ó de reposo, por las corrientes marinas.

Aunque los análisis genéticos pueden ser una rápida y confiable demostración de la identidad entre las poblaciones, la prueba definitiva de una especie, como lo ha señalado Mayr (1979), es la habilidad de producir progenitores fértiles. Así, en el presente nivel de estudio la finalidad fue la determinación del grado de fertilidad entre estas dos poblaciones.

IV.2. Materiales y Métodos

Los detalles de la metodología para la recolección de las muestras del Estero Punta Banda y Mission Bay, que en lo sucesivo son designadas como PB y MB, respectivamente, se encuentran en el capítulo I de este trabajo y en Trujillo-Ortiz *et al.* (1995). Es necesario indicar que la distancia entre los dos lugares de colecta es de aproximadamente 125 km.

Los copépodos tomados de los lugares de estudio fueron concentrados en matraces de 50 ml y transferidos posteriormente a cajas de Petri; se les añadió unas cuantas gotas de solución marina al 1% de MS-222 (metanosulfonato de tricaina), para disminuir la actividad de los organismos durante la selección por sexos, observándolos con un microscopio estereoscópico. El tamaño promedio de las hembras fue de 1.008 mm y el de los machos fue de 0.859 mm. Una vez sexados los copépodos, éstos se transfirieron de las cajas de Patri a viales esterilizados de 25 ml. Los viales contenían 20 ml de agua de mar filtrada a través de filtros de 1 μm y tratada con luz UV; como alimento se usó *Isochrysis tahitiana* en una concentración $\sim 2 \times 10^4$ cels $\cdot\text{ml}^{-1}$. El manejo de los copépodos se efectuó cuidadosamente por tensión superficial con la ayuda de microagujas entomológicas No. 000 fijadas a delgadas varillas de bambú. Cada dos días de les aportó unos cuantos mililitros de *I. tahitiana*.

Para las cruzas intrapoblacional (el orden de las iniciales representan, a los machos de una localidad y hembras de la otra) se seleccionaron hembras y machos de la misma localidad con diez repeticiones. Para las cruzas interpoblacionales se realizaron 30 repeticiones. Debido que *Acartia californiensis* presenta, de acuerdo a Trujillo-Ortiz (1990), un período corto de vida, los experimentos se realizaron en un lapso de una semana a temperatura ambiental ($18 \pm 2^\circ\text{C}$). Los organismos de cada vial experimental se vaciaban en cajas de Petri de vidrio y, bajo el microscopio estereoscópico, se cuantificó el número de nauplios vivos presentes.

Para el desarrollo y crecimiento de los progenitores F_1 , los cuales fueron producto de las intra e intercruzas de *A. californiensis*, fueron respectivamente mezclados como PB-PB, MB-MB, PB-MB y MB-PB. Estos fueron vaciados a vasos de

precipitado de 1000 ml que contenían agua de mar filtrada a 1 μm y tratada con luz UV; en cada vaso había aproximadamente un organismo por cada 10 ml. Se les alimentó hasta el décimo día, *Isochrysis tahitiana* a una concentración de aproximada de 4×10^4 cels·ml⁻¹; debido a que los requerimientos nutricionales de los organismos, desde el undécimo día hasta el final del experimento, se les dió una mezcla en partes iguales de *I. tahitiana* y *Tetraselmis* sp. a una concentración de $\sim 5 \times 10^4$ cels·ml⁻¹. Utilizando un sifón provisto con un tamiz de 4 μm de luz de malla, de cada vaso de precipitado cada tercer día se recambiaban 560 ml de agua de mar y alimento fresco. La temperatura ambiental fue de $18^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, y se mantuvo a los organismos en estas condiciones por un período de 20 días.

Para probar la viabilidad de la generación F₂, se utilizaron los copépodos adultos de la generación F₁ producidos, bajo las mismas condiciones experimentales usadas en F₁, y en cada caso se montaron cinco réplicas. El período experimental para las cruzas fue de una semana. El diseño para el ensayo de las cruzas intra e interpoblacionales fue el siguiente: PBPB-PBPB y MBMB-MBMB, y PBPB-MBMB, MBMB-PBPB, PBMB-MBPB, MBPB-PBMB, PBMB-PBPB, PBPB-PBMB, PBMB-MBMB, MBMB-PBMB, MBPB-PBPB, PBPB-MBMB, MBPB-MBMB, MBMB-MBPB, PBMB-PBMB y MBPB-MBPB, respectivamente.

En la elección de las hembras en todos los ensayos se puso especial cuidado para evitar la fertilización previa al inicio de las pruebas de fertilidad; para esto se seleccionaron en estadio CV y se mantuvieron en forma separada hasta su maduración para que copularan con el macho experimental. En cada experimento se usó una proporción de sexos de tres machos por hembra.

IV.3. Resultados

Tanto los datos de los experimentos F_1 como F_2 , resultaron ser estadísticamente normales y homocedásticos ($P > 0.05$) aplicando, respectivamente, las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett (Sokal y Rohlf, 1981). Con el propósito de encontrar cualquier diferencia significativa en el número promedio de progenie viva (nauplios) entre las cruza intra e interpoblacionales, se aplicó una prueba ANOVA I de comparaciones planeadas (*a priori*).

No se encontró evidencia alguna que demostrara diferencias estadísticamente significativas entre las progenies F_1 intra e interpoblacionales ($P = 0.272$), ni entre los controles ($P = 0.568$). Sin embargo, si se demostró la existencia de la diferencia significativa entre los productos de las cruza interpoblacionales ($P < 0.001$), con un número promedio de progenie viva mayor para el experimento PB-MB (Tabla 4.1).

Los resultados de los ensayos con la generación F_2 (Tabla 4.2) no mostraron diferencias significativas entre los productos intra e interpoblacionales ($P = 0.287$), así como tampoco entre los organismos resultantes de las cruza interpoblacionales ($P = 0.547$). El ANOVA simple entre las cruza, con excepción de los controles, no mostró diferencia significativa ($F_{[5,64]} = 1.099$, $P = 0.375$).

IV.4. Discusión

El concepto biológico de especie propuesto por Mayr (1979) es aplicable a las poblaciones de *A. californiensis* de PB y MB estudiadas en el presente experimento. No obstante de que existen diferencias estadísticamente significativas en el número

promedio de progenie viva, los resultados en el porcentaje de pares productivos y la viabilidad de la generación F_1 hasta su reproducción resultante en la F_2 y su tasa de supervivencia, hacen evidente de que se trata de una sola especie.

Al considerar las características biológicas de las especies, el grado de aislamiento reducción de *A. californiensis* al menos en su estado adulto, sea probablemente atribuido a su confinamiento exclusivo a los cuerpos de agua costeros. Debido a que ésta especie produce huevos diapáusicos (Johnson, 1980; Grice y Marcus, 1981), se ha postulado una dispersión pasiva por el flujo mareal y las corrientes marinas, y la eclosión de los huevos como requisitos necesarios para el éxito frente a la selección natural (Hedgecock, 1986), permitiendo así el desarrollo de la siguiente generación de progenie y la homogenización del reservorio genético que le confieren su identidad como especie.

Aunque sin comprobar, se ha inferido o sugerido que tal identidad está dada por el flujo de los huevos diapáusicos; por lo que el presente experimento pudiera apoyar tal hipótesis, ya que es aceptado que para probar la existencia de dos especies separadas es suficiente demostrar su incompatibilidad reproductiva (Mayr, 1979). En este trabajo se encontró la evidencia contraria, confirmando un nivel apropiado de éxito reproductivo intraespecífico (Ayala y Kiger, 1984).

El alto número de individuos generados en las cruzas interpoblacionales de *A. californiensis* (PB y MB), comparados con los controles, corrobora la hipótesis de que se trata de una sola especie. Así se demuestra que existen similitudes entre las poblaciones estudiadas en base a los grados de viabilidad de la progenie producida.

No se tomaron precauciones para prevenir los posibles efectos del canibalismo que pudieran presentar los adultos de *A. californiensis* sobre huevos y nauplios, tal

como se ha observado que ocurre con *A. tonsa*, especie congénérica omnívora (Lonsdale *et al.*, 1979). Sería interesante conducir experimentos para investigar si los adultos de *A. californiensis* presentan tal comportamiento depredador.

IV.5. Referencias

- Ayala, F. J. y Kiger, J. A. (1984). Genética Moderna. Fondo Educativo Interamericano. México, D.F.
- Battaglia, B. (1956). Differenziamento fisiologico e incipiente isolamento intraespecifico in *Tisbe reticulata* Bocquet. *Atti Istituto Veneto di Scienze*, 114: 111-125.
- Bozic, B. (1960). Le genre *Tigriopus* Norman (Copépodes: Harpacticoides) et ses formes européennes; recherches morphologiques et expérimentales. *Ar. Zool. Exp. Gén.*, 98: 167-269.
- Burton, R. S. (1986). Evolutionary consequences of restricted gene flow among natural populations of the copepod, *Tigriopus californicus*. Proceedings of the invertebrate larval biology workshop held at Friday Harbor Marine Laboratories, University of Washington, 26-30 march, 1995. *Bull. Mar. Sci.*, 39 (2): 526-535.
- Burton, R. S. (1987). Differentiation and integration of the genome in populations of the marine copepod *Tigriopus californicus*. *Evolution*, 41: 504-513.
- Burton, R. S. (1990). Hybrid breakdown in physiological response: a mechanistic approach. *Evolution*, 44: 1806-1813.
- Burton, R. S. y Feldman, M. W. (1981). Population genetics of *Tigriopus californicus*. II. Differentiation among neighbouring populations. *Evolution*, 35: 1192-1205.
- Carrillo-Barrios-Gómez, E., Miller, C. B. y Wiebe, P. H. (1974). Failure of interbreeding between Atlantic and Pacific populations of the marine calanoid copepod *Acartia clausi* Giesbrecht. *Limnol. Oceanogr.*, 19: 452-458.
- Grice, G. D. y Marcus, N. H. (1981). Dormant eggs of marine copepods. *Ocean. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 19: 125-140.
- Hedgecock, D. (1986). Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bull. Mar. Sci.*, 39: 550-564.

- Johnson, J. K. (1980). Effects of temperature and salinity on production and hatching of dormant eggs of *Acartia californiensis* (Copepoda) in a Oregon estuary. Fish. Bull., 77: 567-584.
- Lonsdale, D.J., Heinle, D. R. y Siegfred, C. (1979). Carnivorous feeding behaviour of the adult calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 36: 235-248.
- Mayr, E. (1979). Animal Species and Evolution. Cambridge, Massachusetts: The Belknap Press of Harvard University Press.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. (1981). Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research- 2nd Ed., W. H. Freedman & Co., San Francisco.
- Trujillo-Ortiz, A. (1990). Porcentaje de eclosión, producción de huevos y tiempo de desarrollo de *Acartia californiensis* Trinast bajo condiciones de laboratorio. Ciencias Marinas, 16(1): 1-22.
- Trujillo-Ortiz, A. y Arroyo-Ortega, J.E. (1991). Análisis de la mortalidad y esperanza de vida de *Acartia californiensis* (Copepoda: Calanoida) bajo condiciones de laboratorio. Ciencias Marinas, 17(4): 11-18.
- Trujillo-Ortiz, A., Burton, R. S., de la Rosa-Vélez, J. y Correa- Sandoval, F. (1995). Variación genética en dos poblaciones del copépedo calanoide marino *Acartia californiensis* Trinast. Ciencias Marinas, 21(1): 39-58.

IV.6. Figuras y Tablas

Tabla 4.1. Análisis estadístico de la progenie viva del experimento para F_1 de *Acartia californiensis*; razón de sexo 3M:1H.

Experimento M-H	Promedio \pm e.e.	No. repeticiones	Progenie	ANOVA 1 planeado		
PB-PB	29.00 \pm 5.83	10	N	1	1	0
MB-MB	24.00 \pm 5.23	10	N	1	-1	0
PB-MB	40.73 \pm 4.00	30	S	-1	0	1
MB-PB	23.40 \pm 3.33	30	S	-1	0	-1
				$F_{(1,76)}=1.225$, $P=0.272$ ns	$F_{(1,76)}=0.329$, $P=0.568$ ns	$F_{(1,76)}=11.874$, $P<0.001$ ***

Estadísticos: F , razón de varianza; e.e., error estándar; ns, no significativo; ***, $0.0001 < P < 0.001$. M, macho; H, hembra; PB, Estero Punta Banda; MB, Mission Bay; e.e.: N, no; S, sí.

Tabla 4.2. Resultados del análisis estadístico para la progenie viva de las 16 combinaciones de cruzas de *Acartia californiensis* para el experimento F₂; razón de sexo 3M:1H.

Experimento M-H	Promedio ± e.e.	No. repeticiones	Progenie	ANOVA I planeado	
PBPB-PBPB	32.20 ± 4.40	5	N	7	1
PBPB-MBMB	41.20 ± 11.18	5	S	-1	0
PBPB-PBMB	24.40 ± 9.73	5	S	-1	0
PBPB-MBPB	23.20 ± 10.46	5	S	-1	0
MBMB-PBPB	28.00 ± 4.93	5	S	-1	0
MBMB-MBMB	25.40 ± 4.94	5	N	7	-1
MBMB-PBMB	30.00 ± 9.18	5	S	-1	0
MBMB-MBPB	9.60 ± 6.28	5	S	-1	0
PBMB-PBPB	27.00 ± 12.93	5	S	-1	0
PBMB-MBMB	19.20 ± 5.91	5	S	-1	0
PBMB-PBMB	17.20 ± 8.06	5	S	-1	0
PBMB-MBPB	18.60 ± 7.26	5	S	-1	0
MBPB-PBPB	22.20 ± 7.75	5	S	-1	0
MBPB-MBMB	16.80 ± 6.08	5	S	-1	0
MBPB-PBMB	27.40 ± 5.77	5	S	-1	0
MBPB-MBPB	8.20 ± 6.02	5	S	-1	0
				$F_{(1,74)}=1.154$ $P=0.287$ ns	$F_{(1,74)}=0.367$ $P=0.547$ ns

Estadísticos: *F*, razón de varianza; e.e., error estándar; ns, no significativo. M, macho; H, hembra; PB, Estero Punta Banda; MB, Mission Bay; N, no; S, si.

CAPÍTULO V

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES GENERALES

V.1. Discusiones

A través del polimorfismo alozimático de un sólo locus, como lo han revelado las poblaciones de *Acartia californiensis* estudiadas para PGI-1, no se hace evidente la relación interpoblacional; sin embargo, esto se logró por medio de la secuenciación del fragmento de ADN mitocondrial COI. Existen dos posibles razones: (1) un bajo poder de resolución de la electroforesis proteínica, y (2) la selección natural a un locus ha favorecido el mantenimiento alozimático polimórfico de las poblaciones.

De acuerdo a Parker *et al.* (1998), para tener una mínima confianza estadística, en muchos de los estudios alozimáticos se requieren al menos 10-20 loci polimórficos con al menos dos alelos con una frecuencia mínima de 0.05. Desafortunadamente, tal como es el caso de *Acartia californiensis*, algunas especies son monomórficas para la mayoría de las alozimas ensayadas.

Estrechas especies endémicas y otras que han experimentado efectos de cuello de botella frecuentemente carecen de loci polimórficos (Barrett y Kohn, 1991). En algunos casos, aún en especies ampliamente distribuidas y con una aparente

variabilidad genética en los caracteres morfológicos, pueden ser monomórficos para todos ó la mayoría de las alozimas (Mashburn *et al.*, 1978). Así, a menudo uno se encuentra con especies donde las alozimas no pueden usarse como marcadores genéticos.

Otra limitación de usar las alozimas como marcadores genéticos es que pueden diferir en las funciones metabólicas (Mitton, 1989). Es probable que los resultados aquí obtenidos evidencien la hipótesis de un patrón de amplia escala de alelos alozimáticos que son mantenidos por la selección.

Con más de 25 años de investigación, aún no resulta claro si los loci alozimáticos son el blanco de la selección ó si existen otros loci en contacto directo con las alozimas que están bajo ella (Mitton, 1998).

La importancia del polimorfismo molecular en la adaptación de los organismos a medios ambientes heterogeneos ha sido un controvertido tema en la biología evolutiva. Aunque el polimorfismo puede ser una fase temporal en la evolución molecular y de poca significancia adaptativa (Kimura y Ohta, 1971), la diversidad ambiental y la estabilidad pueden jugar un papel importante en el mantenimiento de muchos polimorfismos genéticos (Hedrick *et al.*, 1976; Powell y Taylor, 1979).

El flujo y la deriva genética son igualmente afectados por los loci neutrales, mientras que la selección a un locus específico. Las alozimas suelen representar un papel selectivo en la diferenciación del hábitat (Dufresne *et al.*, 2002).

La comparación de la estructura genética de un loci putativo seleccionado, con los obtenidos de un loci más neutral como el ADN mitocondrial, es la mejor manera de investigar el papel de la selección en la variabilidad alélica (Lewontin y Krakauer, 1973).

Existe un buen número de investigaciones en diversas especies marinas que apoyan el papel del mantenimiento de la selección por polimorfismo genético en loci alozimáticos: selección a la temperatura en el locus lactato deshidrogenasa (LDH) en el pez *Fundulus heteroclitus* (DiMichele y Powers, 1982; VanBeneden y Powers, 1989; Powers y Schulte, 1998), selección de la osmoregulación en leucin-aminopeptidasa (LAP) en el mejillón azul *Mytilus edulis* (Koehn *et al.*, 1980; Hall, 1985; Koehn y Hilbish, 1987; Silva *et al.*, 1989), diferencias en la aptitud entre variantes genotípicas del locus glutamato-piruvato transaminasa (GPT) en y entre poblaciones del copépodo harpacticoide intermareal *Tigriopus californicus*, que experimenta grandes fluctuaciones en la temperatura y la salinidad (Burton y Feldman, 1983), selección a la temperatura por manosa-6-fosfato isomerasa (MPI) en el balanus *Semibalanus balanoides* (Schmidt y Rand, 1999), y en fosfoglucosa isomerasa (PGI) en anfípodos del género *Gammarus* (Patarnello *et al.*, 1989; Patarnello y Battaglia, 1992) y en la anemona marina *Metridium senile* (Hoffman, 1981, 1983; Zamer y Hoffman, 1989).

Se ha descrito una situación similar en la adaptabilidad térmica diferencial de PGI en las capacidades de vuelo de la mariposa del género *Colias* (Watt *et al.*, 1983), en plantas de la especie *Clarkia* (Jones *et al.*, 1986) y evidencias indirectas en algunas poblaciones Antárticas de *Euphausia crystallorophias* y *E. superba* (Kühl y Schneppenheim, 1986; Fevolden, 1988).

La historia de la genética poblacional se ha caracterizado por la lucha en entender la variabilidad existente en las poblaciones (Lewontin, 1974). Se han desarrollado una gran cantidad de modelos teóricos simples para la segregación Mendeliana, mutación, migración, deriva génica, endogamia y muchos de los patrones de selección, como la variabilidad (Marks y Ptak, 2000).

En particular, las discusiones sobre el mantenimiento microevolutivo de la variación genética se han establecido como resultado del polimorfismo por la ventaja de los heterocigotos a la aptitud. Pero esto no es lo suficientemente robusto. Las condiciones analíticas para el mantenimiento de tres ó más alelos, como resultado unicamente de la selección, es mucho más complicado que para dos alelos (Hartl y Clark, 1989).

En base al polimorfismo observado para PGI-1, es probable que en las poblaciones estudiadas de *Acartia californiensis* la salinidad puede ser un importante agente selectivo. Se observa una fuerte continuidad geográfica promedio en la distribución de PGI como una probable consecuencia del efecto de la selección en la configuración del patrón de adaptabilidad a gran escala.

De cualquier manera y de acuerdo a Sévigny y Odense (1985), existen ciertos problemas en el estudio de polimorfismos proteínicos de animales de especies diminutas como es la obvia limitación de tejido para la extracción de enzimas específicas, que para poder detectarlas se requiere que el nivel de actividad sea mucho mayor que la actividad total presente. Como se debe usar todo el organismo, consecuentemente el extracto contiene todos los sistemas isoenzimáticos de los tejidos e incluyen enzimas proteolíticas e inhibidoras que digieren, desnaturalizan ó inactivan las enzimas, modificando y alterando los patrones. Así, se requieren de técnicas lo suficientemente sensitivas para detectar los diminutos niveles de la actividad enzimática en los geles.

La evidencia genética molecular puede ser utilizada para definir poblaciones ó grupos reproductivamente aislados. Los marcadores genéticos moleculares parecen no ser afectados por la selección natural, de manera que las diferencias geográficas en las

frecuencias genéticas pueden interpretarse en términos del flujo y la deriva génica. El análisis de las distribuciones geográficas de los marcadores pueden revelar las dispersiones, los niveles de equilibrio de la migración (flujo génico) y el aislamiento. A través de estos marcadores, considerados neutrales, se puede evidenciar la divergencia genética entre las poblaciones, pero ofrecen poca información directa respecto a la falta de las diferencias genéticas adaptativas (Waples, 1995).

El análisis del marcador molecular ADNmt COI, a nivel loci individual, reveló que existe una significativa partición de la variabilidad total en las frecuencias alélicas de las poblaciones, pudiéndose evidenciar cuatro clados bien definidos.

Los patrones de flujo genético entre las poblaciones de *Acartia californiensis* aquí estudiadas inferidos de las descripciones de la estructura genética poblacional por diversos métodos estadísticos como la diversidad nucleotídica, el análisis jerárquico de variación molecular por AMOVA y la reconstrucción de árboles genéticos, hace que, examinando el nivel de variabilidad de la secuencia del ADNmt, que se asume es selectivamente neutral, la presencia de diferencias significativas en el maquiillaje genético de poblaciones coespecíficas puede ser considerado como resultado de un limitado intercambio entre ellas. Para las dos poblaciones localizadas en el extremo norte (Yaquina Bay, Oregon, y San Francisco Bay, California; $N_e m = 0.011$) y la más sureña (Ensenada de La Paz, Baja California Sur; $N_e m = 0.009$) de la distribución zoogeográfica, el flujo genético resultó altamente restringido debido al infrecuente intercambio entre estos cuerpos de agua costeros donde se encuentran; pero resultó alto entre el resto de las poblaciones localizadas al sur de California-centro de Baja California ($N_e m = 1.905$), lo que las hace genéticamente homogéneas.

No obstante la falta de registros fósiles para establecer de manera directa un reloj molecular relevante para las poblaciones de *Acartia californiensis*, Knowlton *et al.* (1993) ofrecen datos recientes sobre el gen COI para otros crustáceos revelan estimaciones de 2.2-2.6% de divergencia por millón de años (MA). A tal tasa de evolución de la secuencia, de manera conservadora (2.4%), usando el paquete MEGA (Kumar *et al.*, 1999) la fecha aproximada para la separación entre los clados Yaquina Bay y San Francisco Bay es del orden de los 5.8 MA, mientras que entre los clados sur de California-centro de Baja California y Ensenada de La Paz es de unos 4 MA.

La variabilidad genética es fundamental para la supervivencia de las especies a largo plazo e importante en la adaptabilidad a los cambios ambientales. *Acartia californiensis* posee un ciclo de vida que incluye la producción de huevos diapáusicos bentónicos que le permite retener formas viejas y divergentes de linajes mitocondriales como resultado del mantenimiento y protección de la selección en la acumulación de huevos en este estado.

Los huevos diapáusicos permiten retardar el desarrollo embriológico y acumularse en los sedimentos en espera de condiciones ambientales más favorables. La importancia de la diversidad genética almacenada en reservorios de huevos diapáusicos (bancos de huevos), para diversas especies de organismos zooplanctónicos ha sido discutida en detalle por Hairston y De Stasio (1988) y Marcus *et al.* (1994). Este almacén de diversidad genética resulta en una población de tamaño grande y efectiva, que consecuentemente permite mantener la diversidad genética a niveles altos (Avisé *et al.*, 1988).

Existen dos decisiones fundamentales a las que se enfrentan los organismos en el reparto de la historia de vida: (1) como aportar los recursos que se invierten en la

reproducción entre el tamaño de la descendencia y el número de descendientes, y (2) cuanto recurso invertir en la reproducción común contra cuanto ahorrar para la supervivencia futura y la reproducción.

La genética poblacional, más que un simple término, es el estudio de las características individuales y no de grupos ó conjunto de individuos. Es imposible poder predecir el destino que tendrá un individuo zooplanctónico, pero puede ser posible determinar la proporción de los individuos migrantes de una determinada región en una escala de tiempo oceanográfica.

El régimen fluido de los océanos requiere que pensemos de forma diferente acerca de la dinámica de las especies planctónicas respecto a las terrestres. En primer lugar, las poblaciones planctónicas son más difíciles de delimitar, tanto numérica como espacialmente. En segundo, el medio planctónico puede no estar caracterizado por comunidades estables, sino por efimeros ensamblajes de poblaciones transitorias.

El concepto de población como una entidad genéticamente cohesiva y geográficamente persistente puede no tener significado en este sistema, donde los procesos físicos pueden intermezclar a individuos de diferentes regiones e individuos de una misma fuente pueden tener diferentes destinos. Por otro lado, existe evidencia de estabilidad en la abundancia relativa de especies planctónicas en regiones geográficas por largos períodos de tiempo (Fager y McGowan, 1963; Ashjian y Wishner, 1993).

Aunque los organismos planctónicos pueden atravesar miles de kilómetros y viajar en patrones de circulación a gran escala, la estructura de la comunidad puede mantenerse en intensos regímenes advectivos por fenómenos a mesoescala coherentes y persistentes (Wiebe *et al.*, 1992). Bucklin *et al.* (1989) encontró que la

advección jugaba un papel significativo en la distribución de poblaciones genéticamente distintas de *Metridia pacifica* a través de los filamentos costeros de la corriente de California en escalas <10 km.

Las Corrientes con Frontera Este (CFE) típicamente son serpenteantes (erráticas) y de movimiento lento, lo que las hace oceanográficamente complejas y biológicamente ricas. A ese tipo de corrientes pertenece la Corriente de California, que exhibe una estructura de mesoescala persistente lo cual resulta en una significativa estructura espacial de sus propiedades biológicas (Haury *et al.*, 1986; Pelaez y McGowan, 1986, y Strub *et al.*, 1991).

Por largo tiempo se han debatido cuestiones acerca de la importancia relativa de la advección y de la reproducción *in situ* con la finalidad de determinar los patrones de la abundancia zooplanctónica a gran escala presente en la Corriente de California (Chelton *et al.*, 1982). Debido a que muchos de los eventos de transporte en la Corriente de California son episódicos, más que predecibles, como el efecto del viento e intensidad de las surgencias y el transporte oceánico vía los filamentos costeros; los movimientos y mezcla de las poblaciones planctónicas en los campos de flujo son difíciles de entender por medio de observaciones directas. Los patrones en la dispersión (transporte y mezcla) y supervivencia del plancton pueden inferirse a partir del estudio de la estructura genética poblacional de las especies a todo lo largo de su rango de distribución geográfica.

De acuerdo a US-GLOBEC (1994), el Sistema de la Corriente de California (SCC) abarca más de 26 grados de latitud norte a lo largo de la costa este del Océano Pacífico y se ha dividido en cuatro regiones (**Fig. 5.1**), cada una separada por fronteras físicas y/o biológicas más ó menos distintas (Parrish *et al.*, 1981). De norte a sur existe:

Región I (50° - 43° N) que se extiende de la Isla de Vancouver, al sur de Columbia Británica, Canadá, hacia el sur de la vecindad de Cabo Blanco, Oregon a Cabo Mendocino, California; Región II (35° - 43° N) que incluye la parte norte y central de California, de Cabo Mendocino a Punta Concepción; Región III (30° - 35° N) correspondiente al sur de la Bahía del Sur de California a Punta Baja, Baja California, México y regiones de mar abierto; y Región IV (sur de los 30° - 23° N) de Punta Baja, Baja California a Cabo San Lucas, Baja California Sur. Cada una de las regiones se caracteriza por presentar diferencias en el efecto del viento, intensidad de las surgencias costeras, morfología costera, entradas de agua dulce, procesos de advección a gran escala y nivel de la actividad a mesoescala. Aunque las fronteras pueden ser identificadas por características geográficas, algunas pueden ser un tanto difusas, responder a conocidos cambios en los eventos interanuales como El Niño-Oscilación del Sur (ENOS) ó presentar variaciones climáticas de largo plazo. En algunos casos, estas mismas fronteras, incluso regiones enteras, pueden separar provincias biológicas.

El SCC tiene tres principales corrientes: la Corriente de California que se dirige al ecuador, y la Corriente de Davidson y la Corriente Subsuperficial, que se dirigen al norte.

Respecto al promedio de la altura dinámica a largo plazo (**Fig. 5.2**), la Corriente de California es lenta y con un flujo hacia el ecuador que se extiende al sur partiendo del flujo trans-Pacífico del viento de deriva oeste. La Corriente Subsuperficial corre a lo largo de la pendiente continental (Huyer, 1983; Chelton, 1984; Hickey, 1979, 1989). La Corriente de Davidson es el flujo hacia el norte, próximo a la costa, que se extiende a la superficie de octubre a febrero.

Estas corrientes y otras características transitorias del SCC se identifican por propiedades únicas de las masas de agua presentes (Hickey, 1979). El agua de la Corriente de California es fría, reciente, y con un alto contenido de nutrientes y oxígeno disuelto. La Corriente Subsuperficial, que parte de las regiones ecuatoriales y que se dirige al norte transporta agua con temperatura, salinidad y nutrientes relativamente altos, y bajo oxígeno disuelto. El agua Subtropical del oeste y la Pacífico-Ecuatorial del sur son más cálidas y contienen menos nutrientes y oxígeno disuelto. Los chorros y meandros presentes en la Región II están asociados a agua de surgencias generalmente frías, saladas, ricas en nutrientes y pobres en oxígeno (Huyer *et al.*, 1991).

Para la determinación de la abundancia poblacional de los organismos planctónicos en el océano, la dispersión por los procesos advectivos puede ser relativamente más importante que la reproducción *in situ* y la mortalidad.

Con el propósito de entender las causas y naturaleza de las fluctuaciones poblacionales en las especies planctónicas marinas, se considera que los principales protagonistas son los patrones de circulación oceánica y los procesos de mezcla. Los patrones de la producción secundaria en el océano pueden estar principalmente gobernados por los procesos de dispersión dirigidos por la circulación oceánica. Para poder entender y predecir esos patrones, tanto espacial como temporalmente, es necesario entender las relaciones entre circulación, dispersión y reproducción.

Como se ha visto, la Región I experimenta las tormentas invernales más fuertes con moderadas surgencias en verano, mientras que la Región II tormentas de invierno menos intensas. Vientos seguidos de una 'transición de primavera' favorecen las surgencias, siendo las más fuertes en la Región II (Huyer *et al.*, 1979; Strub y James,

zooplancton no puede reproducirse?; ¿tienen algunos sistemas planctónicos celdas de recirculación tal que, en escala espacial y temporal, se recicle la producción biológica y se mantenga una población genéticamente distinta?; ¿son las especies planctónicas genéticamente cohesivas ó están fraccionadas por la formación de razas geográficas ó subespecies? Todas estas interrogantes se centran en un fenómeno ecológico: la dispersión.

En el zooplancton marino la dispersión se puede inferir a partir de la estructura genética poblacional de las especies, por medio de análisis estadísticos desarrollados para el estudio de la teoría genética (Wright, 1969). Para realizar esto, es necesario determinar las frecuencias de los rasgos individuales de las poblaciones geográficas de las especies y analizarse por métodos estadísticos apropiados. Durante muchos años el uso de las características genéticas para examinar la estructura poblacional y los patrones del flujo genético ha sido una área de intensa investigación (Awise, 1974; Wilson *et al.*, 1985). Los métodos genéticos pueden ayudar a resolver preguntas planteadas desde hace mucho tiempo sobre la dispersión del zooplancton en el océano. Las características genéticas tienen la ventaja de que no son difíciles de identificar en individuos ó linajes, y los métodos genéticos poblacionales aportan conclusiones estadísticas, más que determinísticas, sobre la dinámica de las poblaciones zooplanctónicas en el océano.

La subdivisión entre las poblaciones de una especie incrementa el potencial para la diferenciación genética debido a la selección ó la deriva. *Acartia californiensis* tiene el potencial para la dispersión a gran distancia por medio de los huevos en estado de reposo (diapáusicos), que parece ser el vector de conexión. De acuerdo a Bucklin *et al.* (1989), la relación entre las estructuras biológica y física pueden aportar valiosa

información respecto a la contribución de la dinámica del océano a la variabilidad biológica de los organismos. Trinast (1975) afirma que los sistemas de corrientes ejercen una fuerte influencia en la retención, translocación y dispersión de poblaciones, y que la conservación de *Acartia* n. sp. (*A. californiensis*) puede parcialmente explicarse por la tendencia a congregarse en el fondo durante el reflujo mareal, yéndose a los sistemas de giros; sin embargo, es probable que no todos los huevos en diapausia sean retenidos y una gran parte de ellos salgan a mar abierto, y bajo esta condición, enfrentarse, y como ya se explicó, a la compleja dinámica ejercida por el SCC. Por otro lado, algunas características de especies que viven en hábitats separados, tales como aguas con diferentes grados de salinidad, producen una alta verosimilitud en la divergencia evolutiva (Carvahlo, 1993).

En particular y de acuerdo al análisis de la dinámica oceánica, es altamente probable que la persistencia del clado localizado al sur de California-centro de Baja California, abarcando las poblaciones de Marina del Rey, Sunset Beach Marina, Mission Bay, Estero Punta Banda y Laguna de Guerrero Negro, sea fundamentalmente mantenido por el efecto de las surgencias, haciendo que la componente vertical resultante favorezca la resuspensión y la homogenización de los huevos diapáusicos que son inyectados de los cuerpos costeros al mar.

Los clados conformados coinciden con las características oceanográficas como son corrientes e isotermas para el Pacífico Nororiental. Al comparar las subdivisiones biogeográficas señaladas por Veimej (1980), Escobar y Arenillas (1988) y Correa (2002), coinciden bastante con las provincias Oregoniana (de aguas templado-frías), Californiana (de aguas templado-cálidas), Mexicana (de aguas subtropicales) y la Zona de Transición entre la Californiana y la Mexicana (Fig. 5.3). Sin embargo, es necesario

tener en consideración que tales secuencias del gene COI no son afectadas por el medio ambiente; es decir, son mutaciones al azar.

Las regiones de surgencias a lo largo de la costa oriental de norteamérica, desde México hasta Alaska, están entre las regiones biológicamente más productivas del océano (Brown *et al.*, 1989). Durante la mayor parte del año fuertes vientos del norte y noroestes, que junto con la rotación de la tierra, inducen el transporte hacia fuera de la costa de agua costera superficial, produciendo que surga agua fría y altamente nutritiva del fondo para reemplazar el agua superficial (Lalli y Parsons, 1993).

Utilizando un índice aproximado de surgencias (Bakun, 1973), derivado de datos de la componente del efecto del viento a lo largo de la costa sobre la superficie del mar (T_a) convertido en transporte de Ekman fuera de la costa (presión atmosférica superficial) y expresados en metros cúbicos (toneladas métricas) por segundo por metro de costa (100 m de línea de costa) [$T_a = \cos\theta T_y - B \sin\theta T_x$; donde T_y es la componente del efecto hacia el norte, T_x hacia el este, $\cos\theta$ es el $\cos\theta$, B el $\sin\theta$], se ha determinado que el máximo se presenta en primavera-verano y propagándose hacia el norte; donde las surgencias más intensas ocurren cerca de los 30 - 39° N: las costas central y sur de California (Fig. 5.4) [Dorman y Palmer, 1981], coincidiendo con el clado aquí definido como sur de California-centro de Baja California. Al norte de los 36°, en invierno, el viento cambia hacia el sur, resultando en un transporte de Ekman superficial costero y una convergencia. Cerca de los 50° N. los vientos tienden a favorecer las surgencias por un período de 1 a 3 meses. Al sur de los 36° N, durante todo el año, los vientos favorecen la presencia de las surgencias, pero en invierno los vientos del norte las debilitan considerablemente (Dorman y Palmer, 1981).

La evolución de cualquier carácter bajo selección natural está mediado a través de su impacto sobre la historia de vida. Así, el reto central de la biología es el de entender el efecto de cada rasgo que posee el organismo (molecular, de desarrollo, fisiológico, morfológico ó de comportamiento) sobre la supervivencia y la reproducción en el medio ambiente donde vive (Hairston y Bohonak, 1998).

Todos los medios ambientes varían temporalmente y muchos se hacen limitantes para el crecimiento, reproducción ó la supervivencia. Una manera que los copépodos pueden evitar estos períodos críticos, como *Acartia californiensis*, es de entrar en diapausia; un estado de retraso en el desarrollo que es mediado neurohormonalmente (Tauber *et al.*, 1986) y que conduce a una significativa reducción de la tasa de crecimiento poblacional potencial debido al alargamiento del tiempo generacional. Así, la diapausia debe tener importantes consecuencias en la aptitud, haciendo que exista selección natural para la optimización del tiempo y la duración (Hairston y Bohonak, 1998).

Una vez que el copépodo entra en estado de diapausia, ¿cuánto tiempo permanece en este estado? Dependiendo de la especie ó del hábitat, ó de ambos, el rango máximo de edad puede ser de 2 a 300 años, y el promedio puede ir de un año a 50-70 años (Marcus *et al.*, 1994; Hairston *et al.*, 1995; Hairston, 1996).

El número de huevos diapáusicos en los sedimentos ('bancos de huevos'), en el caso de copépodos centropagidos son impresionantes. Las densidades típicas de huevos en medios ambientes marinos y cuerpos costeros varían entre 10^4 y 10^6 m^{-2} (Hairston, 1996).

Así, una diapausia prolongada reduce la variabilidad de la aptitud, proveyendo un mecanismo para promediar temporalmente el medio ambiente. En contraste, la

dispersión reduce la variabilidad de la aptitud promediando espacialmente el medio ambiente. Teóricamente, se ha sugerido que cuando la probabilidad de dispersión es alta, es menos probable que se de una diapausia prolongada (Levin *et al.*, 1984; Cohen y Levin, 1985).

De acuerdo a Maltagliati (1998) los estudios sobre los patrones de la distribución geográfica de los genotipos y de las modalidades del flujo genético son necesarios para determinar la estructura genética de una especie. La distribución diferencial de los genotipos en la determinación de la subdivisión genética de una especie depende principalmente de la interacción entre la historia de vida y las características del hábitat. La influencia de ambos, así como del flujo genético, es fundamental para determinar el grado de la estructura poblacional que muestran las especies. El flujo genético incluye todos los eventos que resultan de los movimientos de los genes de una población a otra (Slatkin, 1985, 1987) y juega un papel fundamental en la determinación de la estructura genética de las especies (Slatkin, 1987). Un extenso flujo genético puede reducir la evolución interdependiente de las poblaciones, previniendo la deriva génica y la selección natural del establecimiento y mantenimiento de la diferenciación entre las poblaciones locales. Por otro lado, el bajo potencial del flujo genético por lo general determina un alto grado de diferenciación entre las poblaciones (Waples, 1987). Así, los niveles de flujo génico dependen tanto de las capacidades de dispersión de los organismos ó gametos relativo a las barreras geográficas, físico-químicas y ecológicas, como a la migración ó de la aptitud de los migrantes.

Un interesante y particular ejemplo de cómo diferentes marcadores genéticos en algunas ocasiones revelan cuadros contradictorios del comportamiento del flujo genético entre las poblaciones es el del ostión americano *Crassostrea virginica* del

Golfo de México y costas sudorientales de Estados Unidos (Buroker, 1983; Reeb y Avise, 1990; Karl y Avise, 1992). Esto señala la necesidad de tener cuidado en las inferencias que se hacen respecto a la estructura genética y el flujo genético a partir de un sólo gene ó una clase de marcador de loci.

V.2. Conclusiones

1. Los análisis genéticos ensayados para investigar la estructura genética del copépodo calanoide *Acartia californiensis* mostraron resultados contrastantes.
2. El análisis alozimático no presenta una clara estructura genética de las poblaciones de *Acartia californiensis* en la costa nororiental del Pacífico.
3. Se considera que el polimorfismo alozimático para el único locus revelado, PGI-1, pudiera favorecer la selección natural de *Acartia californiensis* como respuesta a la variabilidad imperante de factores ambientales en los cuerpos de agua costeros como la salinidad.
4. Se encontró una clara diferenciación en la estructura genética poblacional por la secuenciación del fragmento del gene ADN mitocondrial citocromo-oxidasa c subunidad I, pudiéndose caracterizar cuatro clados bien definidos a lo largo de su distribución zoogeográfica.
5. El flujo génico resultó significativo sólo en el clado aquí definido como sur de California-centro de Baja California.
6. Es probable que la componente espacio-vertical –surgencias- sea el principal factor que mantiene la resuspensión y homogenización de la carga genética

contenida en los huevos en estado diapáusico (vector de flujo genético), fundamentalmente en el clado sur de California-centro de Baja California.

7. Es probable que la componente espacio-horizontal –Sistema de la Corriente de California y corrientes mareales- promueva el transporte oceánico de los huevos diapáusicos hacia el norte y al sur, así como en el flujo y reflujo mareal de los cuerpos de agua costeros donde se presentan las poblaciones.

V.3. Recomendaciones

1. Realizar una investigación encaminada a un segundo análisis molecular utilizando el mismo marcador ADNmt COI sólo en las poblaciones de Yaquina Bay y San Francisco Bay utilizando, organismos adultos de *Acartia californiensis* identificados y separados por investigadores colegas con la práctica de haber ó estar trabajando con esta especie (Charlie Miller de Oregon State University, Bill Petersen del Hatfield Marine Science Institute y Steve Bollens del Tomberg Tiburon Center).
2. Con organismos vivos de estos dos lugares y trasladados al laboratorio, llevar a cabo experimentos de intercrusa. De ser posible incluir una de las poblaciones del clado sur de California (Mission Bay ó Estero Punta Banda).
3. Es conveniente conducir de manera combinada experimentos de sobrevivencia y ensayos bioquímicos para investigar la posible selección de actividades enzimáticas de los genotipos de PGI más frecuentes en relación a gradientes de salinidad (p.ej. 25, 30, 35‰ y temperatura (p.ej. 12, 21, 30°C), hasta la segunda generación filial (P , F_1 , F_2) y durante diferentes épocas del año (p.ej. enero, mayo, septiembre). Para su evaluación se puede usar el modelo estadístico de cuadros greco-latinos (p.ej. 3x3), de ser posible con dos ó tres repeticiones.

4. Sería interesante explorar el análisis alozimático con electroforesis en acetato de celulosa, que tiene las siguientes ventajas: puede dar una resolución igual ó superior al de poliacrilamida; cada muestra corre en unos 10 min, por lo se pueden procesar una mayor cantidad; puede trabajar con cantidades de 0.5-2 μ l de extracto (individuos de tamaño \leq 0.5 mm).
5. De ser necesario, hacer una diagnosis morfológica y morfométrica de especímenes adultos de ambos sexos colectados de las diferentes poblaciones.

V.4. Referencias

- Ashjian, C. J. y Wishner, K. F. (1993). Temporal persistence of copepod species groups in the Gulf Stream. *Deep-Sea Res.*, 40:483-516.
- Avise, J. C. (1974). Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.*, 23:465-481.
- Avise, J. C. (1992). Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos*, 63: 62-76.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman-Hall, Inc., New York.
- Avise, J. C., Ball, R. M. y Arnold, J. (1988). Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Mol. Biol. Evol.* 6:258-269.
- Bakun, A. (1973). Coastal upwelling indices, west coast of North America, 1946-1971. US Dept. of Commerce, NOAA Tech. Rep., NMFS SSRF-671.
- Barrett, S. C. H. y Kohn, J. R. (1991). Genetic and evolutionary consequences of small populations size in plants: implications for conservation. En: D. A. Falk y K. E. Holsinger (eds.), *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York, pp. 3-30.
- Brown, J., Colling, A., Park, D., Phillips, J., Rothery, D. y Wright, J. (1989). *Ocean Circulation*. Pergamon Press Ltd., Oxford, England.

- Buckin, A., Rienecker, M. M. y Mooers, C. N. K. (1989). Genetic tracers of zooplankton transport in coastal filaments off Northern California. *J. Geophys. Res.*, 94:8277-8288.
- Buroker, N. E. (1983). Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast and the Gulf of Mexico. *Mar. Biol.*, 75:99-112.
- Burton, R. S. y Feldman, M. W. (1983). Physiological effect of an allozyme polymorphism: Glutamate-pyruvate transaminase and response to hyperosmotic stress in the copepod *Tigriopus californicus*. *Biochem. Genet.*, 21:239-251.
- Carvahlo, G. R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *J. Fish. Biol.*, 43A:53-73.
- Cohen, D. y Levin, S. A. (1985). The interaction between dispersal and dormancy strategies in varying and heterogeneous environments. En: E. Teramoto y M. Yamaguti (eds.), *Mathematical Topics in Population Biology, Morphogenesis and Neurosciences*. Springer, Heidelberg, pp. 110-122.
- Chelton, D. B. (1984). Seasonal variability of alongshore geostrophic velocity off central California. *J. Geophys. Res.*, 89:3473-3486.
- Chelton, D. B., Bernal, P. A. y McGowan, J. A. (1982). Large-scale interannual physical and biological interaction in the California current. *J. Mar. Res.*, 40:1095-1125.
- DiMichele, L. y Powers, D. A. (1982). Physiological basis for swimming endurance between LDH-B genotypes of *Fundulus heteroclitus*. *Science*, 216:1014-1016.
- Dorman, C. E. y Palmer, D. P. (1981). En: F. A. Richards (ed.), *Coastal Upwelling*. American Geophysical Union, Washington, D. C. pp. 44-56.
- Dufresne, F., Bourget, E. y Bernatchez, L. (2002). Differential patterns of spatial divergence in microsatellite and allozyme alleles: further evidence for locus-specific selection in the acorn barnacle, *Semibalanus balanoides*? *Mol. Ecol.*, 11:113-123.
- Fager, E. W. y McGowan, J. A. (1963). Zooplankton species groups in the North Pacific. *Science*, 140:453-460.
- Fevolden, S. E. (1988). Biochemical genetics and populations structure of *Euphausia superba*. *Comp. Biochem. Physiol.* 90(B):507-513.
- Hairston, N. G. Jr. (1996). Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnol. Oceanogr.*, 41:1087-1092.

- Hairston, N. G. Jr. y De Stasio, B. T. Jr. (1988). Rate of evolution slowed by dormant propagule pool. *Nature*, 336:239-242.
- Hairston, N. G. Jr. y Bohonak, A. J. (1998). Copepod reproductive strategies: life-history theory, phylogenetic pattern and invasion of inland waters. *J. Mar. Systems*, 15:23-34.
- Hairston, N. G. Jr., Van Brunt, R. A., Kearns, C. M. y Engstrom, D. E. (1995). Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank. *Ecology*, 76:1706-1711.
- Hall, J. G. (1985). Temperature-related kinetic differentiation of glucosephosphate isomerase alloenzymes isolated from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 86:163-171.
- Hartl, D. y Clark, A. (1989). *Principles of Populations Genetics*. 2nd. Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Haurly, L. R., Simpson, J. J., Pelaez, J., Koblinsky, C. J. y Wiesenhahn, D. (1986). Biological consequences of a recurrent eddy off Point Conception, California. *J. Geophys. Res.*, 91:12937-12956.
- Hedrick, P. W., Ginevan, M. E. y Ewing, E. P. (1976). Genetic polymorphism in heterogeneous environments. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 7:1-32.
- Hickey, B. M. (1979). The California current system – hypotheses and facts. *Progr. Oceanogr.*, 8:191-279.
- Hickey, B. M. (1989). Patterns and processes of circulation over the continental shelf off Washington. En: M. R. Landry y B. M. Hickey (eds.), *Coastal Oceanography of Washington and Oregon*. Elsevier, New York, pp. 41-45.
- Hoffman, R. J. (1981). Evolutionary genetics of *Metridium senile*. I. Kinetic differences in phosphoglucose isomerase allozymes. *Biochem. Genet.* 19:145-154.
- Hoffman, R. J. (1983). Temperature modulation of the kinetics of phosphoglucose isomerase genetic variants from the sea anemone *Metridium senile*. *J. Exp. Zool.*, 227:361-370.
- Huyer, A. (1983). Coastal upwelling in the California Current System. *Prog. Oceanogr.*, 12:259-284.
- Huyer, A., Sobey, E. J. C. y Smith, R. L. (1979). The spring transition in currents over the Oregon continental shelf. *J. Geophys. Res.*, 84:6995-7011.

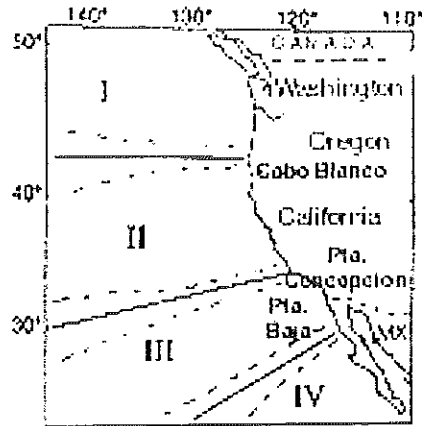
- Huyer, A., Korso, P. M., Fleischebein, J., Ramp, S. R., Stanton, T., Washburn, L., Chavez, F. P., Cowles, T. J., Pierce, S. D. y Smith, R. L. (1991). Currents and water masses of the coastal transition zone off northern California., June to August 1988. *J. Geophys. Res.*, 96:14809-14832.
- Jones, T. W. A., Pichersky, E. y Gottlieb, L. D. (1986). Enzyme activity in ems-induced null mutations of duplicated genes encoding phosphoglucose isomerase in *Clarkia*. *Genetics*, 113:101-114.
- Karl, S. A. y Avise, J. C. (1992). Balancing selection at allozymes loci in oysters: implications from nuclear RFLPs. *Science*, 256:100-102.
- Kimura, M. y Ohta, T. (1971). Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. *Nature*, 229:467-469.
- Knowlton, N., Weigt, L. A., Solorzano, L. A., Mills, D. K. y Bermingham, E. (1993). Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compativility across the Isthmus of Panama. *Science*, 260:1629-1632.
- Koehn, R. K., Newell, R. I. E. e Immerman, F. (1980). Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 77:5385-5389.
- Koehn, R. K. y Hilbish, T. J. (1987). The adaptative importance of genetic variation. *Am. Scientist.*, 75:134-140.
- Kühl, S. y Schneppenheim, R. (1986). Electrophoretic investigation of genetic variation in two krill species *Euphausia superba* and *E. crystallophias* (Euphausiidae). *Polar Biol.*, 6:17-23.
- Kumar, S., Tamura, K. y Nei, M. (1999). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 1.12. The Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Lalli, C. M. y Parsons, T. R. (1993). *Biological Oceanography: An Introduction*. Elsevier Sciences Ltd, Oxford, U. K.
- Levin, S. A., Cohen, D. y Hastings, A. (1984). Dispersal strategies in patchy environments. *Theor. Populat. Biol.*, 26:165-191.
- Lewontin, R. C. (1974). *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. Univ. Press, New York.

- Lewontin, R. C. y Krakauer, J. (1973). Distribution of gene frequency as a test of the theory of selective neutrality of polymorphisms. *Genetics*, 74:174-195.
- Lynn, R. J. y Simpson, J. J. (1987). The California current system: the seasonal variability of its physical characteristics. *J. Geophys. Res.*, 92:12947-12966.
- Maltagliati, F. (1998). Does the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Teleostei: Cyprinodontidae) fit the one-dimensional stepping-stone model of gene flow? *Env. Biol. Fish.*, 53:385-392.
- Marcus, N. H., Lutz, R., Burnett, W. y Cable, P. (1994). Age, viability, and vertical distribution of zooplankton resting eggs from an anoxic basin: evidence of an egg bank. *Limnol. Oceanogr.*, 39:154-158.
- Marks, R. W. y Ptak, S. E. (2000). The maintenance of single-locus polymorphism. V. Sex dependent viabilities. *Selection* 1, 1-3:217-228.
- Mashburn, S. J., Sharitz, R. R. y Smith, M. H. (1978). Genetic variation among *Typha* populations of the southeastern United States. *Evolution*, 32:681-685.
- Mitton, J. B. (1989). Physiological and demographic variation associated with allozyme variation. En: D. E. Soltis y P. S. Soltis (eds), *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, Portland, Oregon, pp. 87-105.
- Mitton, J. B. (1998). Molecular markers and neutral selection. En: G. R. Carvalho (ed), *Advances in Molecular Ecology*. Nato Science Series, IOS Press, Amsterdam, pp. 225-241.
- Parker, P. G., Snow, A. A., Schug, M. D., Booton, G. C. y Fuerst, P. A. (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79: 361-382.
- Parrish, R. H., Nelson, C. S. y Bakun, A. (1981). Transport mechanisms and reproductive success of fishes in the California Current. *Biol. Oceanogr.*, 1:175-203.
- Patarnello, T., Bisol, P. M. y Battaglia, B. (1989). Studies on differential fitness of *PGI* genotype with regard to temperature in *Gammarus insensibilis* (Crustacea: Amphipoda). *Mar. Biol.*, 102:355-359.
- Patarnello, T. y Battaglia, B. (1992). Glucosephosphate isomerase and fitness: effects of temperature on genotype dependent mortality and enzyme activity in two species of the genus *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda). *Evolution*, 46:1568-1573.

- Pelaez, J. y McGowan, J. A. (1986). Phytoplankton pigment patterns in the California Current as determined by satellite. *Limnol. Oceanogr.*, 31:927-950.
- Powell, J. R. y Taylor, C. E. (1979). Genetic variation in ecologically diverse environments. *Am. Sci.*, 67:590-596.
- Powers, D. A. y Schulte, P. M. (1998). Evolutionary adaptations of gene structure and expression in natural populations in relation to a changing environment: a multidisciplinary approach to address the million-year saga of a small fish. *J. Exp. Zool.*, 282:71-94.
- Reeb, C. A. y Avise, J. C. (1990). A genetic discontinuity in a continuously distributed species mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics*, 124:397-406.
- Sévigny, J. M. y Odense, P. (1985). Comparison of isoenzyme systems of calanoid copepods by use of ultrathin agarose gel isoelectric focusing techniques. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80B:455-461.
- Schmidt, P. S. y Rand, D. M. (1999). Intertidal microhabitat and selection at *MPI*: interlocus contrasts in the northern acorn barnacle, *Semibalanus balanoides*. *Evolution*, 53:135-146.
- Silva, P. J. N., Koehn, R. J., Diehl III, W. J., Ertl, R. P., Winshell, E. B. y Santos, M. (1989). The effects of glucose-6-phosphate isomerase genotype on *in vitro* specific activity and *in vivo* flux in *Mytilus edulis*. *Biochem. Genet.* 25:451-467.
- Slatkin, M. (1985). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39:53-65.
- Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236:787-792.
- Strub, P. T. y James, C. (1988). Atmospheric conditions during the spring and fall transitions in the coastal ocean off western United States. *J. Geophys. Res.*, 93:15561-15584.
- Strub, P. T., Kosro, P. M., Huyer, A. y CTZ Collaborators. (1991). The nature of the cold filaments in the California Current System. *J. Geophys. Res.*, 96:14743-14768.
- Tauber, M. J., Tauber, C. A. y Masaki, S. (1986). *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford Univ. Press, New York.

- Trinast, E. M. (1975). Tidal currents and *Acartia* distribution in Newport Bay, California. Est. Coast. Mar. Sci., 3:165-176.
- US-GLOBEC (1994). A Science Plan for the California Current, Rep. No. 11, US-GLOBEC Office, University of California, Davis.
- VanBeneden, R. J. y Powers, D. A. (1989). Structural and functional differentiation of two clinally distributed glucosephosphate isomerase allelic isozymes from the teleost *Fundulus heteroclitus*. Mol. Biol. Evol.6:123-130.
- Waples, R. S. (1987). A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. Evolution, 41:385-400.
- Waples, R. S. (1995). Evolutionary significant units and the conservation of biological diversity under Endangered Species Act. American Fisheries Society Symposium 17:8-27.
- Watt, W. B., Cassin, R. C. y Swan, M. S. (1983). Adaptation at specific loci. III. Field behavior and survivorship differences among *Colias PGI* genotypes are predictable from *in vitro* biochemistry. Genetics, 103:725-739.
- Wiebe, P. H., Copley, N. J. y Boyd, S. H. (1992). Coarse-scale horizontal patchiness and vertical migration of zooplankton in Gulf Stream warm-core ring 82-H. Deep-Sea Res., 39:S247-S278.
- Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M. Jr., Gyllesten, U. B., Helm-Bychowsky, K. M., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R., Prager, E. M., Sage, R. D. y Stoneking, M. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol. J. Linn. Soc., 26:375-400.
- Wright, S. (1969). Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 2, The Theory of Gene Frequencies. Univ. Chicago Press, Chicago, Ill.
- Zamer, W. E. y Hoffman, R. J. (1989). Allozymes of glucose-6-phosphate isomerase differentially modulate pentose-shunt metabolism in the sea anemone *Metridium senile*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 86:2737-2741.

V.5. Figuras y Tablas



	Región I	Región II	Región III	Región IV
Tormentas	De invierno e intensas	De invierno y moderadas	De invierno y escasas	Infrecuentes y provenientes del trópico
Vientos	Se invierte el efecto estacional del viento	El viento favorece las surgencias	Mínimo efecto a lo largo de la costa	Efecto moderado y persistente a lo largo de la costa
Surgencias	Surgencias moderadas de primavera/verano	Intensas surgencias de primavera/verano	Surgencias débiles	Modestas surgencias durante el año
Aporte de agua dulce	Significante entrada de agua	Mínima entrada de agua	Insignificante entrada de agua	Insignificante entrada de agua
Relieve costero	Línea de costa relativamente suave	Principales accidentes costeros	Costa cóncava, islas y cuencas subsuperficiales	Algunos accidentes costeros
Protección/criaderos	Principales estuarios/lugares de crianza	Pocas bahías y estuarios	Bahías protegidas	Algunas bahías protegidas
Circulación	Advección moderada, actividad a mesoescala	Advección extrema, actividad a mesoescala	Intensa recirculación local, prolongados tiempos de residencia, débil actividad a mesoescala, fuerte estratificación, principales mezclas de masas de agua	Advección moderada, actividad a mesoescala
Productividad	Fuerte productividad primaria estacional	Fuerte productividad primaria estacional	Abatimiento estacional de la productividad primaria	Moderada estacionalidad en la productividad primaria
Biomasa zooplanctónica	Biomasa zooplanctónica fuertemente estacional (frecuentemente los copépodos invernan en el fondo)	Biomasa zooplanctónica estacional	Modesta estacionalidad en la biomasa zooplanctónica	Abatimiento en la biomasa zooplanctónica
Desove	Desove agregado por peces epipelágicos	Mínimo desove latitudinal por peces epipelágicos	Máximo desove latitudinal por peces epipelágicos	Desove agregado por peces epipelágicos

Figura 5.1. Variación regional generalizada de los procesos físicos y biológicos dentro del Sistema de la Corriente de California. Los límites entre las regiones son aproximados y varían en el tiempo. Las generalizaciones para la Región III, se aplica principalmente a la Bahía del Sur de California.

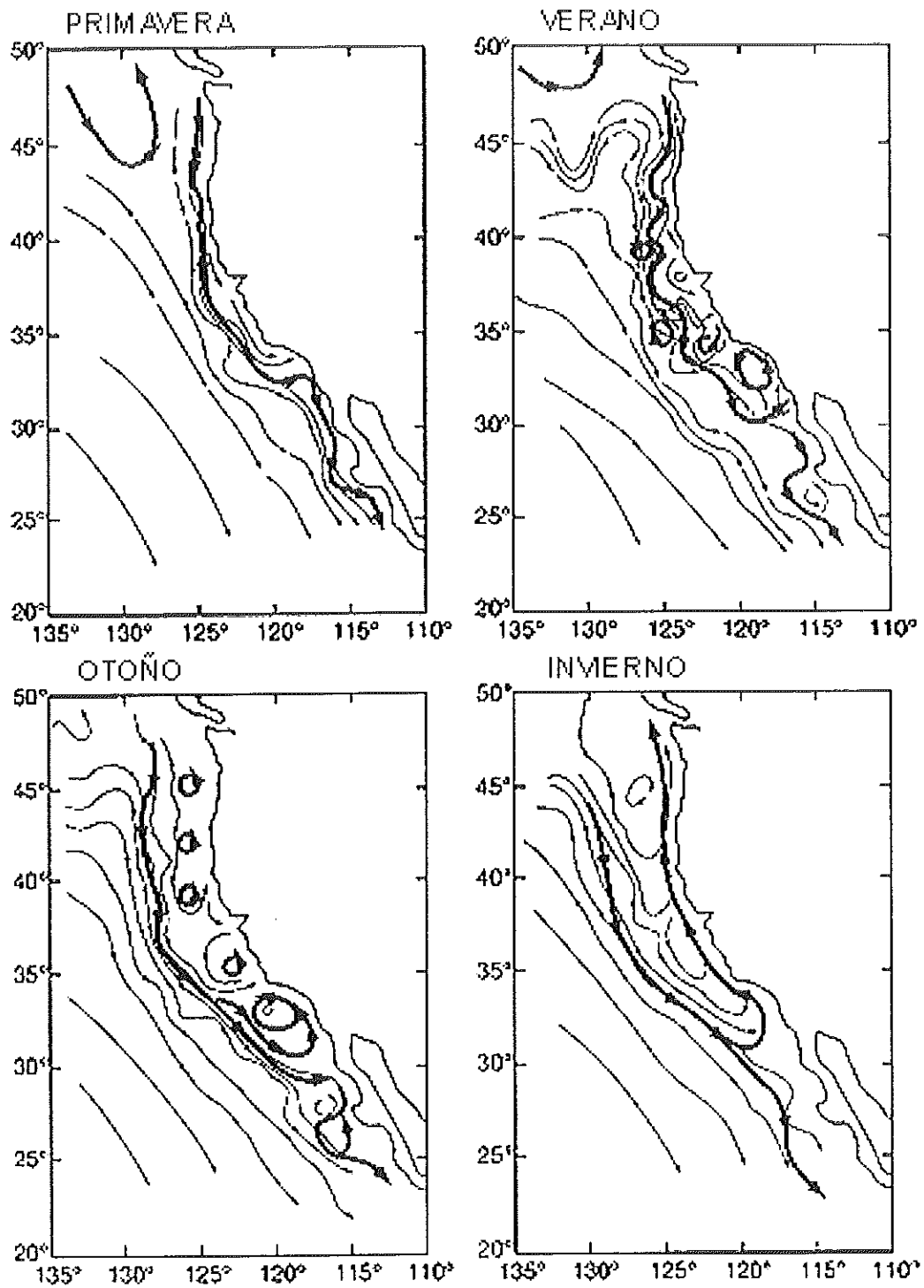


Figura 5.2. Esquema de la circulación superficial promedio estacional del Sistema de la Corriente de California (basado en Hickey, 1979; 1989; Lynn y Simpson, 1987; y análisis de alturas del altímetro Geosat, Strub, no publicado).

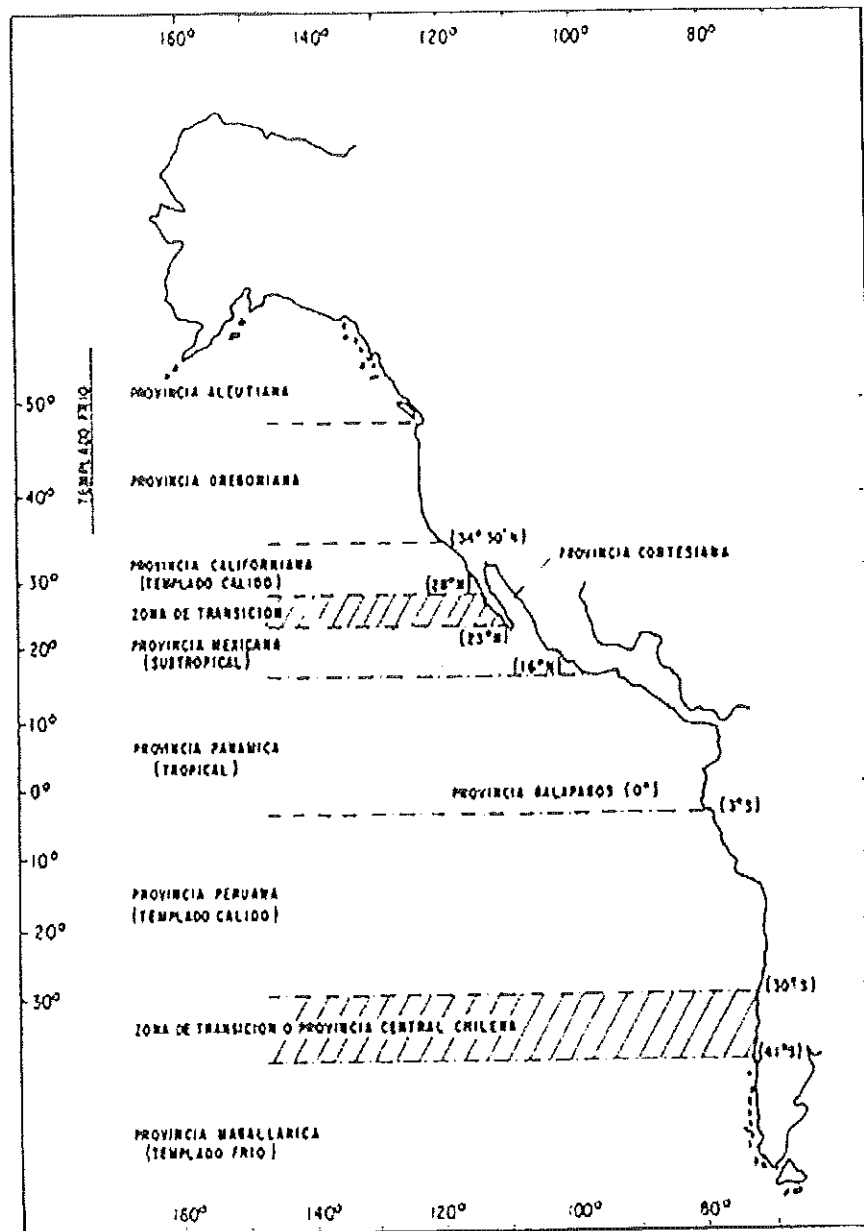


Figura 5.3. Localización de las provincias zoogeográficas establecidas para el Océano Pacífico Oriental.

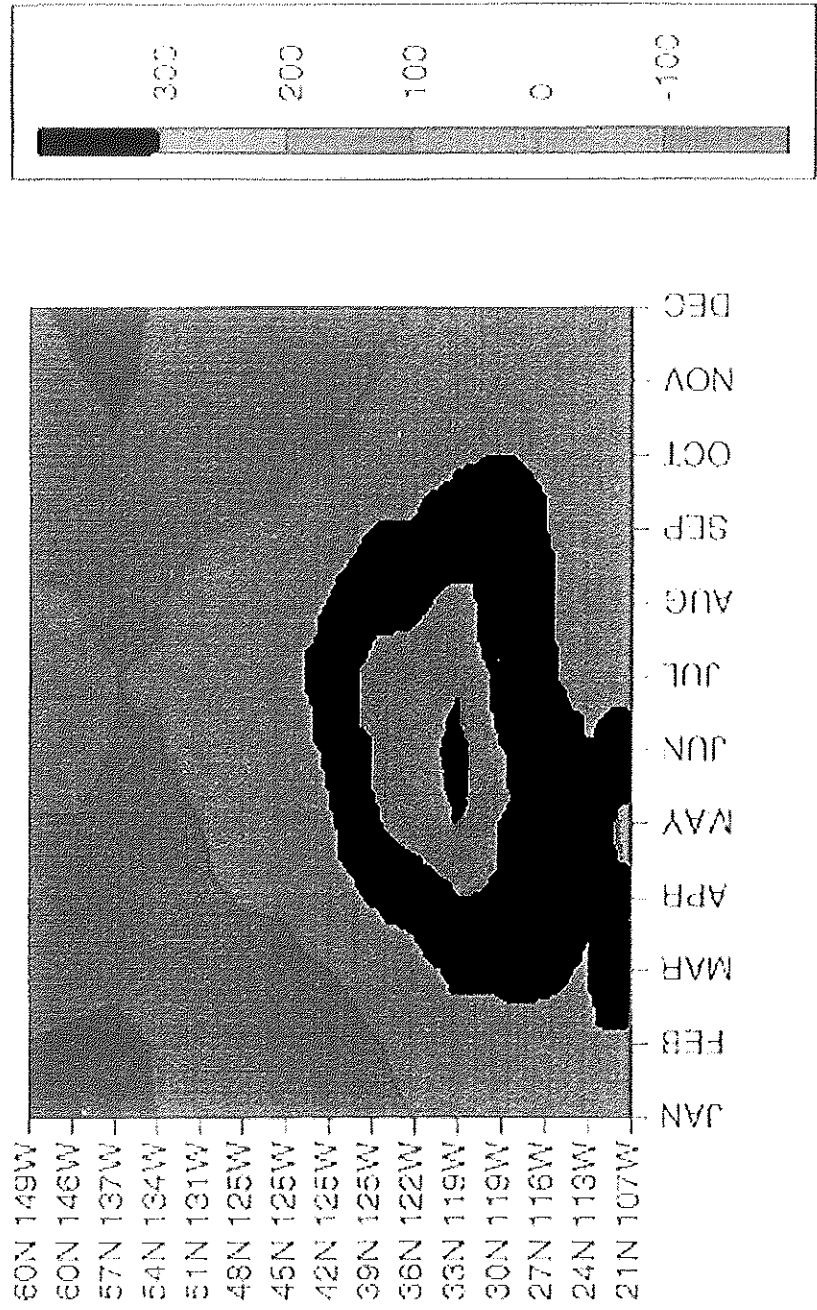


Figura 5.4. Índices de surgencia promedio mensuales para la costa oeste de norteamérica para el periodo de 1963-92 determinados a intervalos de 3° de latitud.